

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

NÖTROFİL HÜCRE DIŞI TUZAKLARININ OLUŞUMUNDA
(NETOSİS) DEK PROTEİNİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

İR FAN BAKİ KILIÇ

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

TEMMUZ 2024

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**NÖTROPİL HÜCRE DIŞI TUZAKLARININ
OLUŞUMUNDA (NETOSİS) DEK PROTEİNİNİN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

İRFAN BAKİ KILIÇ

**DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN: PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

TEMMUZ 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN
DEK PROTEİN AND NETOSIS FORMATION**

İRİFAN BAKİ KILIÇ

A THESIS OF DOCTORATE
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETİCS**

ADVISOR: PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

JULY 2024

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 08/07/2024 tarih ve 2024/35 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 08/07/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan İrfan Baki KILIÇ 'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) :Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

:Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU

ÜYE

:Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

:Dr. Öğr. Üyesi Zihni Onur ÇALIŞKANER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

DEK proteini ilk olarak kromozomal translokasyon sonucu DEK-NUP214 kimerik geni ile keşfedilmiştir. Yoğunlukla kromatine bağlı halde çekirdekte bulunmasına rağmen post translasyonel modifikasyonlar sonucu DNA'ya olan afinitesini kaybederek hücre dışı aktif ve pasif olarak serbest ya da eksozomlar aracılığı ile salınır. Salgılanan DEK proteini nötrofiller ve T hücreleri için kemo-çekici fonksiyon gösterir. Aynı zamanda CXCR1/2 reseptörlerine bağlanabilen IL-8 (CXCL8) gibi kemokinlere benzer ELR motifi taşıyan DEK, hematopoietik kök hücrelerin proliferasyonunu CXCR2 aracılığı ile düzenler. Juvenil idiyopatik artrit hastalarının eklemlerinde bulunan DEK ve DEK oto-antikorları ile yapılan çalışmalarda Dek geni silinen farelerin nötrofillerinin özgün bir savunma mekanizması olan nötrofil hücre dışı tuzaklar (NET) oluşturmadığı fakat rekombinant fare DEK (rDEK) muamelesinin bu özelliği geri kazandırdığı görülmüştür. Otoimmün hastalıklar dışında COVID-19'da da görev aldığı bilinen NET oluşumunda salgılanan DEK ve IL-8'in rolü bilinmemektedir. DEK proteininin sağlıklı insan nötrofillerinde NET oluşturma kapasitesi, rDEK ile uyarılan nötrofillerde immüno Floresan boyama, morfolojik analizler ve NET ilişkili miyeloperoksidaz analizi yapılarak ilk kez bu tez çalışmasında gösterildi. rDEK ile uyarılan NET oluşumunun anti-DEK antikorları ve CXCR1/2 reseptörlerinin inhibitörü olan reparixin ile baskılandığı ve rDEK ile uyarılan NET oluşumunda CXCR1/2 reseptörlerinin rol oynadığı belirlendi. Ardından sağlıklı bireylerde (kontrol; n=60) ve hem akut (n=23) hem de konvalesan (n=45) evredeki COVID-19 hastalarının serumlarında DEK, inflamatuvar sitokinler ve NET belirteçlerinin konsantrasyonu ELISA yöntemiyle tespit edildi; incelenen sitokin ve NET belirteçleri arasında korelasyon olduğu (DEK proteini ile sağlıklı bireylerdeki IL-8, akut evre bireylerdeki IL-1 β ve MPO, ve tüm COVID-19 hastaları beraber incelendiğinde MPO ile negatif; konvalesan evre bireylerdeki IL-1 β , tüm COVID-19 hastaları beraber incelendiğindeki IL-6 ve IL-1 β ile pozitif korelasyon) tespit edildi. Ayrıca, gerek sağlıklı insan nötrofillerinde gerekse COVID-19 hastalarının serumları veya rIL8 ile uyarılan nötrofillerde oluşan NETosis'te, DEK proteininin beklenen aksine çekirdekte değil, nötrofil elastaza benzer şekilde şekilde sitoplazmik granüllerde lokalize olduğu ve NET yapılarında ancak eser miktarda yer aldığı gösterildi. Son olarak COVID-19 hasta serumlarının sağlıklı nötrofillerde NETosisi uyarmasında DEK ve IL-8 konsantrasyonlarının belirleyici rol oynadığı ve NET oluşumunun anti-DEK ve anti-IL-8 antikorlarına ek olarak reparixin ile de baskılabildiği gösterildi.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 120S979 projesi ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DEK, NETosis, COVID-19, CXCR2, anti-DEK

ABSTRACT

DEK protein was first discovered through the DEK-NUP214 chimeric gene as a result of chromosomal translocation. Although it is mostly found in the nucleus bound to chromatin, DEK loses its affinity for DNA as a result of post-translational modifications and is released from outside the cell, actively or passively, and free or through exosomes. Secreted DEK protein functions as a chemoattractant for neutrophils and T cells. DEK, which carries an ELR motif similar to chemokines such as IL-8 (CXCL8), which can also bind to CXCR1/2 receptors, regulates the proliferation of hematopoietic stem cells through CXCR2. Interestingly, in studies conducted with DEK and DEK auto-antibodies found in the joints of Juvenile Idiopathic Arthritis patients, it was observed that neutrophils of mice with DEK gene deletion are unable to form neutrophil extracellular traps (NET), a neutrophil-specific defense mechanism, but mouse recombinant DEK (rDEK) treatment restored this feature. The role of secreted DEK and IL-8 in NET formation, which plays a role in COVID-19 as well as autoimmune diseases, is still unknown. In this thesis study, the NET-forming capacity of the DEK protein was demonstrated, first time, by stimulating NETosis with rDEK in healthy neutrophils evaluated morphologically by immunofluorescence staining, and enzymatically by NET-associated myeloperoxidase analysis. This effect was confirmed by suppressing rDEK-induced NET formation with anti-DEK antibodies and Reparixin which shows CXCR1/2 receptors play a role in rDEK-induced NET formation. Then, the concentration of DEK, cytokine, and NET markers in the serum of healthy individuals and COVID-19 patients in both acute and convalescent stages were determined by the ELISA method, and correlations were found between DEK and the examined cytokine and NET markers that could be associated with NET formation and prognosis of the disease. In addition, in COVID-19 serum and rIL8-stimulated neutrophils, DEK protein, contrary to expectations, was found not in the nucleus but in the granules, showing a similar localization with neutrophil elastase, but it was observed that it did not participate in NET structures or was included in trace amounts. Finally, it has been shown that DEK and IL-8 concentrations play a decisive role in the stimulation of NETosis in healthy neutrophils of COVID-19 patient sera and that NET formation can be suppressed by reparixin in addition to anti-DEK and anti-IL-8 antibodies.

This thesis work was supported by TUBITAK 120S979 grants.

Keywords: DEK, NETosis, COVID-19, CXCR2, anti-DEK

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana destek veren tüm değerli insanlara teşekkürü bir borç bilirim. Öncelikle, danışmanım Prof. Dr. Ayten Kandilci'ye en derin şükranlarımı sunmak isterim. Kendisi, tezimin her aşamasında bana rehberlik ederek, karşılaştığım zorlukları aşmamda büyük rol oynadı. Bilgi ve deneyimlerini sabırla paylaşarak, akademik gelişimime katkıda bulundu. Her zaman motive edici ve yapıcı geri bildirimleriyle, araştırmamı daha ileriye taşıdı.

Bu süreçte bana destek olan arkadaşlarım ve hocalarım Arş. Gör. Dr. Emrah Özçelik, Öğr. Gör. Dr. Merve Tuzlakoglu Öztürk, Öğr. Gör. Dr. İrem Yalım Camcı ve Dr. Türkan Güzel'e özel bir teşekkür etmek istiyorum. Onların bilgi birikimi ve deneyimlerinden yararlanmak, benim için büyük bir şanstı. Her zaman yardıma hazır olmaları ve tecrübelerini paylaşmaları, araştırma sürecimi daha verimli hale getirdi.

Tez süresince yanımda olan, moral ve motivasyon kaynağım olan arkadaşlarım başta Açelya Yaşar, Agit Çetinkaya, Hilal Civelek, Arzu Aysan, Nurşah Ersezen, Dilan Yoleri, Ahmet Kalaycı, Hasan Akyol ve Leyla Dikmedaş'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Onların varlığı, zor zamanlarımda bana güç ve destek verdi. Birlikte geçirdiğimiz uzun çalışma saatleri, bu süreci daha katlanılabilir ve hatta keyifli hale getirdi.

Aileme, özellikle annem Zeynep Kılıç, babam İbrahim Kılıç ve kardeşlerim Basri Kılıç ve Burak Kılıç'a sonsuz minnettarım. Her zaman yanımda olup, bana inandıkları ve desteklerini hiç esirgemedikleri için onlara teşekkür ederim. Ailemin desteği, bana her zaman güç verdi ve zorlukların üstesinden gelmemi sağladı.

Bu tezin hazırlanmasında maddi manevi desteğini esirgemeyen, her adımda yanımda olan ve beni cesaretlendiren Saba Selvi'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Onun bitmek bilmeyen sabrı, anlayışı ve sevgi dolu desteği bu süreçte benim için en büyük motivasyon kaynağı olmuştur. Zor zamanlarımda bana gösterdiği destek ve moral, hedeflerime ulaşmamda bana güç vermiştir. Her zorlukta yanımda durarak, başarabileceğime olan inancını her daim hissettirmiştir. Bu zorlu süreçte yanımda olduğu ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmadığı için minnettarım.

Tez çalışması TÜBİTAK 120S979 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca doktora eğitimim süresince BİDEB 2211 /A Genel Yurtiçi Doktora Bursu ile beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. NÖTROFİLLER	4
2.1. Nötrofillerin Yaşam Döngüsü ve Granülopöz	4
2.2. Nötrofil Granülleri ve Gruplandırılması	5
2.3. Nötrofillerin Aktivasyonu	6
2.4. Nötrofil Reseptörleri	7
2.4.1. Transendotel Migrasyon Reseptörleri	7
2.4.2. Patojen Tespit Reseptörleri	8
2.5. Nötrofillerin Savunma Mekanizmaları	9
2.5.1. Fagositoz	9
2.5.2. Degranülasyon	10
2.5.3. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları Oluşumu (NETosis)	11
2.5.3.1. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakların Keşfi	11
2.5.3.2. NET'lerin Yapısı ve Bileşenleri	11
2.5.3.3. NETosis Mekanizmaları	12
3. DEK PROTEİNİ	16
3.1. DEK Proteini ve Yapısı	16
3.2. Endojen DEK Proteini ve Görevleri	18
3.3. Salgılanan DEK Proteini ve Görevleri	19
3.4. DEK ile İlişkili Hastalıklar	20
3.5. DEK ve İnflamasyon	21
3.6. DEK Proteininin NET Oluşumundaki Rolü	22
4. KORONA VİRÜS HASTALIĞI (COVID-19)	24
4.1. Koronavirüs Hastalığı İlişkili NETosis	25
4.2. Nötrofiller ve NETosis Hedefli COVID-19 Terapileri	27
5. MATERYAL	29
6. YÖNTEM	33
6.1. COVID-19 Hastalığı Açısında Sağlıklı, Akut ve Konvelesan Bireylerden Serum Materyalinin Eldesi	33
6.2. SARS- CoV-2 Antikor Testi	34
6.3. Nötrofil İzolasyonu	34
6.3.1. ACK Liziz Solüsyonu İle	35
6.3.2. Percoll Gradyent Yöntemi İle	36

6.4. Poly-L-Lysin Kaplama	37
6.5. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları Oluşumunun Uyarılması ve Baskılanması	37
6.6. Sytox Green Boyaması Yoluyla NETosis Değerlendirilmesi	38
6.7. NET İle İlişkili MPO Kantifikasyonu ile NETosis Değerlendirilmesi	38
6.8. DANA I Analizi	39
6.9. İmmünofloresan Boyama	39
6.10. DEK, IL-8, IL-6, IL-1 β , Cit-H3 ve MPO Belirteçlerinin ELISA ile Değerlendirilmesi	41
6.11. İstatistiksel Analiz	41
7. BULGULAR	42
7.1. Rekombinant DEK ve İnterlökin-8 ile Uyarılan Nötrofillerde NETosis	42
7.2. Anti-DEK ve Anti-IL-8 Antikorlarının NETosis'e Etkisi	43
7.3. rDEK ve rIL-8 ile Uyarılan NETosis'in Anti-DEK ve Anti-IL-8 Antikorları ile Baskılanması	46
7.4. rDEK ve rIL-8 ile Uyarılan NETosis'in Reparixin ile Baskılanması	49
7.5. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK, IL-8, IL-6, IL-1 β ve NETosis Belirteçlerinin İncelenmesi	53
7.5.1. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve IL-8 İlişkisi	53
7.5.2. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve IL-6 İlişkisi	55
7.5.3. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve IL-1 β İlişkisi	57
7.5.4. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve MPO İlişkisi	59
7.5.5. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve Cit-H3 İlişkisi	61
7.6. COVID-19 Serumlarının Sağlıklı Nötrofillerde NET Oluşturma Kapasitesi	63
7.7. COVID-19 Serumları ile Uyarılan NETosis'in Anti-DEK ve Anti-IL-8 Antikorları ve Reparixin ile Baskılanması	67
7.7.1. DEK Yüksek- IL-8 Yüksek COVID-19 Serum Örnekleri ile Tetiklenen NETosis	68
7.7.2. DEK Yüksek- IL-8 Düşük COVID-19 Serum Örnekleri ile Tetiklenen NETosis	71
7.7.3. DEK Düşük- IL-8 Yüksek COVID-19 Serum Örnekleri ile Tetiklenen NETosis	73
8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	76
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	93
TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR	94
EKLER	95

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACE2	: Angiotensin-converting enzyme 2
ADP	: Adenosine diphosphate
AF	: Akut Faz (Evre)
AML	: Akut Myeloid Leukemia
AP-1	: Activator Protein - 1
CD62L	: Cluster of Differentiation 62L (L-Selectin)
<i>C. elegans</i>	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
CG	: Catepsin G
cIAP2	: Cellular Inhibitory of Apoptosis Protein 1
CitH3	: Citrullinated Histone H3
CK2	: Casein Kinase 2
COVID-19	: Coronavirus Disease 2019
CR	: Complement Receptor
CXCL	: C-X-C motif Ligand
CXCR	: C-X-C Chemokine Receptör
C/EBP β	: CCAAT/enhancer-binding protein beta
DAMP	: Damage-associated molecular pattern
DEK-1	: DEK proteini izotip 1
DEK-2	: DEK proteini izotip 1
DEK -/-	: DEK Gene Knockout
DTA64	: DEK Targetting Aptamer
EDTA	: Ethylene-diamine-tetra-acetic acid
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELR	: E (glutamic acid) – L (leucine) – R (arginine) motif
FC	: Fragment crystallizable region
GPCR	: G protein-coupled receptor
GSDMD	: Gasdermin D
G-CSF	: Granulocyte colony-stimulating factor
G-CSFR	: Granulocyte colony-stimulating factor receptor
G α i	: Gi alpha subunit
H3	: Histon protein 3
H3K9me3	: Histone 3 lysine 9 trimethylation
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
HMGB1	: High mobility group box - 1
HSPGs	: Heparan Sulfate Proteoglycans
IFN	: Interferon
IgG	: Immünoglobulin G
IL-8	: Interleukin - 8
I κ B α	: Inhibitor of nuclear factor kappa B
JIA	: Juvenile Idiopathic Arthritis
kbp	: Kilobaz çifti
kDa	: Kilo Dalton
KF	: Konvalesan faz
LDN	: Low-Density Neutrophils
LPS	: Lipopolysaccharide

LSK	: Lineage-marker-, Sca-1+ ve c-Kit+
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MCL-1	: Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein
MERS-CoV	: Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
µg	: Mikrogram
miRNA	: Micro-RNA
ml	: Mililitre
MPO	: Myeloperoxidase
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	: Neutrophil Elastase
NET	: Neutrophil Extracellular Traps
NETosis	: NET Formation Process
NF-AT	: Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B : cells (NF-κB)
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
NMR	: Nuclear magnetic resonance
NK	: Natural killer
NLR	: NOD-like Receptors
NOD	: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
NSF	: N-ethylmaleimide-Sensitive Factor
NUP124	: Nucleoporin 214
PAD4	: Protein-arginine deiminase type-4
PAMP	: Pathogen-associated molecular pattern
pg	: Picogram
PMA	: diester phorbol 12- myristate 13- acetate
PMN	: Polymorphonuclear
PPR	: pathogen recognition receptors
PR3	: Proteinase 3
RBD	: Receptor Binding Domain
rDEK	: Recombinant DEK
rIL-8	: Recombinant Interleukin-8
rmDEK	: Recombinant mouse DEK
ROS	: Reactive Oxygen Species
SAP box	: SAF-A/B, Acinus and PIAS box
SARS-CoV-2	: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDF-1	: Stromal cell-derived factor 1
Ser	: Serine amino acid
shRNA	: Short hairpin RNA
SLE	: Systemic Lupus Erythematosus
SNAP	: Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment : Proteins
STAT	: Signal Transducer And Activator Of Transcription
Syk	: Spleen Tyrosine Kinase
t.e.	: Tespit edilemedi
TEM	: Transendothelial Migration Toll-benzeri reseptörler
TLR	: Toll-like Receptor
TMPRSS2	: Transmembrane protease, serine 2
<i>tnf</i>	: Tumor Necrosis Factor gene

TNF α : Tumor Necrosis Factor Alfa
v/v : Volume / Volume
WHO : World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Nötrofillerin yüzeyinde ifade edilen reseptörler ve sinyal yolakları.	8
Şekil 2.2: Nötrofillerin patojenler ile savaşta kullandığı savunma mekanizmaları.	10
Şekil 2.3: Nötrofil hücre dışı tuzak oluşumunun 3 farklı türü.	13
Şekil 3.1: DEK proteinin yapısı ve fonksiyonel bölgeleri.	17
Şekil 4.1: SARS-CoV-2 genomu, yapısı ve fonksiyonel bölgelerinin temsili gösterimi.	25
Şekil 4.2: SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu NET oluşumu ve inflamasyonun şematik gösterimi.	26
Şekil 4.3: COVID-19 hastalarında görülen IL-8 bağlantılı NET oluşumunun anti-IL-8 antikorları ya da CXCR1/2 inhibitörü Reparixin ile inhibisyonu.	28
Şekil 6.1: Periferal kan örneğinin yoğunluk gradyanlı santrifüjlenmesi.	35
Şekil 6.2: Percoll ile gradyan santrifüj sonrası granülositlerin konumu.	37
Şekil 7.1: rDEK ve rIL-8 ile uyarılan nötrofillere ait konfokal mikroskop görüntüleri.	44
Şekil 7.2: Anti-DEK ve Anti-IL-8 antikorlarının sağlıklı nötrofiller üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	46
Şekil 7.3: rDEK ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunun anti-DEK antikorları ile baskılanması.	48
Şekil 7.4: rIL-8 ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunun anti-IL-8 antikoru ile baskılanması.	49
Şekil 7.5: Reparixin'in sağlıklı nötrofiller üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	50
Şekil 7.6: rDEK ve rIL-8 ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunun Reparixin ile baskılanması.	52
Şekil 7.7: Reparixin ön inkübasyonunun rDEK ve rIL-8 ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunu baskılamasının NET ilişkili MPO yöntemiyle belirlenmesi.	53
Şekil 7.8: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki DEK konsantrasyonları.	54
Şekil 7.9: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki IL-8 konsantrasyonları.	56
Şekil 7.10: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki IL-6 konsantrasyonları.	58
Şekil 7.11: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki IL-1 β konsantrasyonları.	60
Şekil 7.12: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki MPO konsantrasyonları.	62
Şekil 7.13: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki Cit-H3 konsantrasyonları.	64
Şekil 7.14: Sağlıklı birey ve COVID-19 hastalarından alınan serumların Reparixin varlığı ve yokluğunda NETosis oluşturma kapasitelerinin immünofloresan boyama ile incelenmesi.	65
Şekil 7.15: Sağlıklı birey ve COVID-19 hastalarından alınan serumlar ile uyarılan nötrofillerde DEK proteininin lokalizasyonu.	66
Şekil 7.16: DEK ve IL-8 konsantrasyonu yüksek serumlar ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması.	70

Şekil 7.17: Yüksek DEK ve düşük IL-8 konsantrasyonlu serumlar ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması.	72
Şekil 7.18: Düşük DEK ve yüksek IL-8 konsantrasyonlu serumlar ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması.	74
Şekil 7.19: COVID-19 serumları ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması.	76
Şekil 8.1: DEK proteini ve etkileşimlerinin COVID-19 ile bağlantıları.	78



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 5.1: Antikorlar.	29
Tablo 5.2: Rekombinant Proteinler.	29
Tablo 5.3: İnhibitörler.	29
Tablo 5.4: Boyalar.	29
Tablo 5.5: Kitler.	30
Tablo 5.6: Kimyasal ve Solüsyonlar.	30
Tablo 5.7: Sarf, plastik ve cam malzemeler.	31
Tablo 5.8: Cihazlar.	32
Tablo 7.1: Serum örneklerinde DEK proteini ile IL-8 sitokini arasındaki ilişki.	54
Tablo 7.2: Serum örneklerinde DEK proteini ile IL-6 sitokini arasındaki ilişki.	56
Tablo 7.3: Serum örneklerinde DEK proteini ile IL-1 β sitokini arasındaki ilişki.	58
Tablo 7.4: Serum örneklerinde DEK proteini ile MPO belirteci arasındaki ilişki.	60
Tablo 7.5: Serum örneklerinde DEK proteini ile Cit-H3 belirteci arasındaki ilişki.	62
Tablo 7.6: NETosis için test edilen sağlıklı birey ve COVID-19 hastası bireylere ait serumların ELISA değerleri.	68

1. GİRİŞ

DEK proteini 43 kDa ağırlığında 375 amino asitten oluşan, histon proteini olmamasına rağmen kromatine bağlanma ve kromatini düzenleme kapasitesine sahip bir nükleer proteindir [von Lindern vd., 1992]. İlk kez 1992 yılında akut miyeloid lösemi hastalığında CAN (NUP214) ile olan kromozomal translokasyon sonucu tanımlanmıştır ve bu özelliği nedeniyle bir proto-onkogen olarak bilinmektedir [von Lindern vd., 1992]. Hem N terminal'inde bulunan SAP ve sözde (pseudo) SAP box bölgeleri ile hem de C terminal bölgesiyle DNA'ya yapı ve sekans spesifik olarak bağlanabildiği gösterilmiştir [Aravind and Koonin, 2000], [Fu vd., 1997]. Replikasyon, transkripsiyon, DNA tamiri, mRNA işlenmesi gibi birçok önemli olayda görev alır [Alexiadis vd., 2000], [Hollenbach vd., 2002], [Kavanaugh vd., 2011], [Liu vd., 2022]. DEK proteininin ifadesi E2F transkripsiyon faktörü ile düzenlenmektedir [Carro vd., 2006]. Aynı zamanda bilinen birçok post-translasyonel modifikasyon bölgesine sahiptir ve fosforillenme sonucunda DNA'ya olan bağlanma kapasitesinin azalarak çekirdekten sitoplazmaya oradan da hücre dışına serbest ya da eksozomlar aracılığı ile salındığı bilinmektedir [Mor- Vaknin vd., 2006], [Mor- Vaknin vd., 2011]. Hücre dışına salgılanan DEK'in hematopoetik kök ve öncül hücrelerin proliferasyonunun düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir [Capitano vd., 2019]. Aynı zamanda Juvenil İdiopatik Artrit (JIA) ve Sistemik Lupus Eritramatoz gibi hastalarda salgılanan DEK ve DEK antikörlerinin miktarının artması salgılanan DEK'in otoimmün hastalıklar ile bağlantısını göstermektedir [Mor- Vaknin vd., 2006], [Wichmann vd., 2000].

CXCL8 (IL-8) gibi kemokine benzer şekilde CXCR2'ye bağlanmayı sağlayan ELR motifi içeren DEK, aynı zamanda IL-8 ile uyarılan makrofajlardan aktif olarak salgılanarak T-hücreleri, monositler ve nötrofiller için kemotaksis uyarıcı özellik göstermektedir [Mor- Vaknin vd., 2006]. Yapılan çalışmalar salgılanan DEK'in CXCR2 aracılığı ile hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonunu düzenlediğini gösterse de salgılanan DEK'in aynı reseptörü taşıyan nötrofiller üzerinde bir etkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Yapılan JIA fare modeli çalışmalarında DEK geni silinmiş fare nötrofillerinin nötrofil hücre dışı tuzakları (NET) oluşturma kapasitesini kaybettiği fakat rekombinant DEK (rDEK) ile muamele edildiğinde bu özelliği geri

kazandıkları raporlanmıştır [Mor- Vaknin vd., 2017]. Bu özelliklerine rağmen rDEK'in tek başına NET oluşturma kapasitesine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca yine otoimmün hastalıklar ile bağlantısı keşfedilen DEK proteininin COVID-19'un neden olduğu inflamasyon ve NET oluşum sürecinde (NETosis) rol alıp almadığı daha önce araştırılmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında literatürde cevabı bulunamayan yukarıda belirtilen sorulara cevap bulmak için ilk olarak DEK proteininin NETosis'deki rolünü araştırmak amacıyla sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller insan rDEK proteini ile muamele edildi ve sonuçlar hem immüno Floresan boyamayla yapısal değişik olarak hem de NET ilişkili miyeloperoksidaz (MPO) analizi ile enzimatik olarak değerlendirildi. rDEK proteini ile uyarılan nötrofillerdeki NETosis anti-DEK antikorları ile de doğrulandı. rDEK'in NET oluşumunu CXCR1/2 yolları üzerinden tetiklediği de benzer analizler yoluyla CXCR1/2 allosterik inhibitörü Reparixin ile baskılanarak doğrulandı. Bu deneylerde nötrofillerde CXCR2 üzerinden NETosis'i uyaran insan rekombinant IL-8 proteini ve nötralize edici antikor ve CXCR2 yolağından bağımsız şekilde NETosisi uyaran PMA kontrol olarak kullanıldı. Sonrasında ise DEK'in COVID-19 ilişkili inflamasyon ve NETosis'deki rolünü araştırmak amacıyla sağlık bireylerden ve COVID-19 hastası bireylerden toplanan serum örneklerinde DEK'e ek olarak IL-8, IL-6, IL1- β gibi inflamatuvar sitokinlerin ve MPO, Cit-H3 gibi NETosis belirteçlerinin konsantrasyonu ELISA yöntemiyle tespit edildikten sonra sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan evredeki COVID-19 hastalarında belirtilen sitokin ve belirteçlerinin konsantrasyonları ile DEK arasındaki olası korelasyonlar değerlendirildi. Yapılan değerlendirmeler sonucu DEK konsantrasyonunun akut ve konvalesan evre COVID-19 hastalarında sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdiği fakat konvalesan evrede istatistiksel olarak anlamlı olmasa da akut evreye göre arttığı belirlendi. Bunlara ek olarak, DEK proteininin sağlıklı bireylerdeki IL-8, akut evre bireylerdeki IL-1 β ve MPO ve tüm COVID-19 hastaları beraber incelendiğindeki MPO ile negatif; konvalesan evre bireylerdeki IL-1 β , tüm COVID-19 hastaları beraber incelendiğindeki IL-6 ve IL-1 β ile pozitif korelasyona sahip olduğu bulundu. Buna ek olarak gerek normal koşullardaki nötrofillerde gerekse COVID-19'lu hasta serumları veya rIL-8 ile uyarılan nötrofillerde DEK proteininin beklenen aksine çekirdekte değil nötrofil elastaz ile benzer lokalizasyon göstererek sitoplazmik granüllerde bulunduğu, buna

rağmen NET ağılarına katılmadığı ya da eser miktarda katıldığı görülmüştür. Son olarak COVID-19 hasta serumlarının, sağlıklı nötrofillerde NETosis'i uyarmasında DEK ve IL-8 konsantrasyonlarının belirleyici rol oynadığı ve bu NET oluşumunun anti-DEK ya da anti-IL-8 antikorları veya CXRC1/2 inhibitörü olan reparixin ile baskılanabildiği hem morfolojik analizler hem de NET ilişkili MPO analizi ile doğrulanmıştır.



2. NÖTROFİLLER

2.1. Nötrofillerin Yaşam Döngüsü ve Granülopoez

Nötrofiller ya da polimorfonükleer lökositler (PMN) doğal bağışıklık sisteminde anahtar görevleri olan ve kan dolaşımında en fazla bulunan lökosit türüdür [Rosales C., 2018]. İlk kez 19. yüzyılın sonlarında Elias Metchnikoff tarafından tanımlanmıştır [Heifets L., 1982]. Kemik iliğinde üretilmelerinin ardından kan dolaşımına katılarak bakteri, mantar ve virüs gibi istilacı mikroorganizmalara karşı savunmada görev alırlar [Witter vd., 2016]. Cilt ya da mukoz membran gibi fiziksel bariyerleri geçerek enfeksiyona sebep olan mikroorganizmaları kan dolaşımından hızlıca enfeksiyon bölgesine göç ederek etkisiz hale getiren ilk hücre popülasyonu olmaları nötrofillerin doğal bağışıklık sistemindeki önemini göstermektedir [Oliveira vd., 2016].

Sağlıklı bir yetişkinin kemik iliğinde günde ortalama olarak $1-2 \times 10^{11}$ nötrofil üretilir [Qu vd., 2023]. Yüksek sayılarda nötrofil üretimine rağmen bu hücrelerin dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 6-8 saat ile sınırlıdır [Summers vd., 2010]. Nötrofiller kemik iliğinde farklılaşmamış hematopoetik kök hücrelerin (HKH) farklılaşması, adanmış (committed) granülosit öncül hücrelerin nötrofillere farklılaşmalarını tamamlaması ve tamamen farklılaşmış olgun nötrofillerin mitoz bölünmesi yoluyla üç farklı hücre popülasyonundan ortaya çıkabilir [Hong C.W., 2017]. Olgunlaşan nötrofillerin kemik iliğinde kan dolaşımına geçmesi ise endotel hücrelerden ve monosit ya da makrofaj gibi diğer bağışıklık sistemi hücrelerinden salgılanan endojen bir sitokin olan granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) ile düzenlenir [Richards vd., 2003].

G-CSF, 25 kDa ağırlığında bir glikoproteindir ve olgunlaşmış nötrofillerin kemik iliğinden dolaşıma katılmasına ek olarak, adanmış öncül hücrelerin miyeloid hücrelere geçişinde ve granülosit öncül hücrelerin proliferasyonunda görev alır [Richards vd., 2003]. Aynı zamanda olgunlaşmış nötrofillerin fonksiyonlarını da etkiler. Enfeksiyon durumunda daha fazla sayıda nötrofile ihtiyaç duyulduğundan plazmadaki G-CSF miktarı da artar. Bu bağlamda G-CSF'in önemli bir immün yanıt düzenleyici olduğu kabul edilir [Hollenstein vd., 2000], [Roberts, A. W., 2005].

Nötrofiller, granülosit öncül hücreler ve hematopoetik kök hücreler yüzeylerinde bulunan G-CSF reseptörü (G-CSFR) ile G-CSF'yi tanır [Lieschke vd., 1994]. G-

CSFR ise bulunduğu hücrede Ras/Mek/Erk1/2, Src ilişkili Lyn ve Hck, serin/tireonin kinaz Akt, Syk tirozin kinaz gibi farklı sinyal yollarını ya da STAT1, STAT3 ve STAT5 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek nötrofillere farklılaşmayı ve nötrofil proliferasyonunu düzenler [**Panopoulos vd., 2008**].

Transselüler migrasyon olarak bilinen nötrofillerin kemik iliğinden kan dolaşımına geçişi CXC kemokin reseptör 4 (CXCR4) ve stromal hücre kaynaklı faktör 1 (SDF-1 ya da CXCL12) etkileşimi ile düzenlenir. Olgunlaşan nötrofiller bir G-protein bağlı reseptör (GPCR) olan CXCR4 ifade ederler ve CXCR4 ve SDF-1 etkileşimi nötrofillerin kemik iliğinden göçünü inhibe eder [**Devine vd., 2008**]. G-CSF ise bu etkileşimi bloklayarak nötrofillerin kemik iliğinden salınarak kan dolaşımına katılımını sağlar [**Semerad vd., 2002**].

2.2. Nötrofil Granülleri ve Gruplandırılması

Nötrofillerin en belirleyici özellikleri sahip oldukları sitoplazmik granüllerdir. Granül olarak adlandırılan bu organeller farklı antimikrobiyal moleküllere sahiptirler ve içeriklerini fagozomlar ya da salgı vezikülleri yardımıyla hücre dışı ortama atabilirler. Granüller içerik olarak belirgin benzerliklere sahip olmasına rağmen içerik farklılıkları ve hematopoez sırasında üretildikleri aşamalara göre temelde 4 farklı kategoriye ayrılırlar [**Onthman vd., 2022**].

Peroksidaz pozitif ya da azurofilik granüller gelişimsel olarak ilk üretilen granüllerdir. Diğer tipler ile karşılaştırıldığında daha büyük bir hacme sahip olan bu granüller antimikrobiyal özelliğe sahip çeşitli protein ve peptitleri içeriğinde bulundurur. Miyeloperoksidaz (MPO), nötrofil elastaz (NE), katepsin G (CG) ve proteinaz 3 (PR3) gibi proteinler ile birçok mikroorganizmayı öldürme kapasitesine sahip katyonik peptitler olan defensin peptitlerini içerir [**Onthman vd., 2022**].

Peroksidaz negatif granüller de kendi içerisinde spesifik ve jelatinaz olarak iki gruba ayrılır. İçerik olarak belirgin farklılıklara sahip olmamalarıyla birlikte, spesifik granüller antimikrobiyal moleküllere ev sahipliği yaparken, jelatinaz granüller daha çok diğer nötrofilik yollara katılarak görev alırlar.

Spesifik granüllerin en önemli içeriği bakterilerin çoğalmakta kullandığı demire bağlanarak miktarını sınırlandıran laktoferrindir [**Onthman vd., 2022**]. Bakteriler büyümek ve çoğalmak için demire ihtiyaç duyarlar. Laktoferrin ise bakterilerin

membranına bağlanarak ihtiyaç duydukları demiri kendine bağlama yoluyla hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin çoğalmasını baskılar. Ayrıca membran hasarlarına sebep olarak bakterileri öldürür [Yamauchi vd., 1993].

Jelatinaz granüller nötrofil ekstrasvazasyonuna aracılık eder ve hücre dışı matrisi sindirmek için gerekli enzimleri sağlar. İçeriğinde ayrıca jelatinaz ve lökolizin gibi bazı metalloproteinazlar bulundurur. Diğer granül tiplerine göre daha küçüktür ve gelişim sırasında en son oluşandır [Onthman vd., 2022].

Nötrofil salgı kesecikleri, çeşitli proteinleri, enzimleri ve bağışıklık tepkisi için önemli molekülleri içeren, zarla kaplı keselerdir. Antibakteriyel proteinler, lizozim gibi enzimler, reseptörler ve yapışma molekülleri ile doludurlar. Bu veziküller, patojenleri öldüren ve parçalayan antibakteriyel maddelerin salınması, nötrofillerin enfeksiyon bölgelerine göç etmesine yardımcı olmak için kemotaksisi kolaylaştırmak, inflamatuvar yanıtları düzenlemek ve doku onarımını teşvik etmek dahil olmak üzere nötrofil fonksiyonlarında önemli roller oynar. Ayrıca patojenleri ve kalıntılarını yutmaya yardımcı olan moleküller içererek fagositoza da yardımcı olurlar. Nötrofiller, enfeksiyon veya iltihaplanma sinyalleri aldıklarında bu veziküllerin içeriğini ekzositoz yoluyla serbest bırakırlar, bu da onları patojenin ortadan kaldırılması ve iltihaplanma yönetimi için hayati hale getirir [Onthman vd., 2022].

2.3. Nötrofillerin Aktivasyonu

Nötrofillerin büyük bir kısmı 6-8 saatlik yarı ömrünü tamamladıktan sonra apoptoza giderek ölür ve hücre artıkları makrofajlar tarafından temizlenir. Geriye kalanlar ise 2 aşamalı bir aktivasyon işlemi tamamlayarak yaşamlarını uzatır ve bağışıklık sistemine yardımcı olacak fagositoz, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, degranülasyon NET oluşturma gibi fonksiyonlar kazanır [Thind vd., 2024]. Sitokinler ya da kemokinler aracılığıyla ilk uyarıyı alan nötrofiller kısmi aktivasyon ya da hazırlanma süreçlerine girer [Hallet vd., 1995]. Hazırlanma sürecinde granüllerini yeniden düzenler ve öncül formda üretilen reseptörlerini hücre zarına göndererek ikinci bir uyarıya yanıt verme kapasitelerini arttırırlar. Son olarak uyarıcı sitokin ve kemokinlere yanıt olarak ifadesi artan transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenleyerek hazırlanma aşamasını tamamlar. Böylece nötrofiller daha uzun bir yarı ömre sahip olur, fonksiyonunu arttırır, enflamasyon bölgesinden

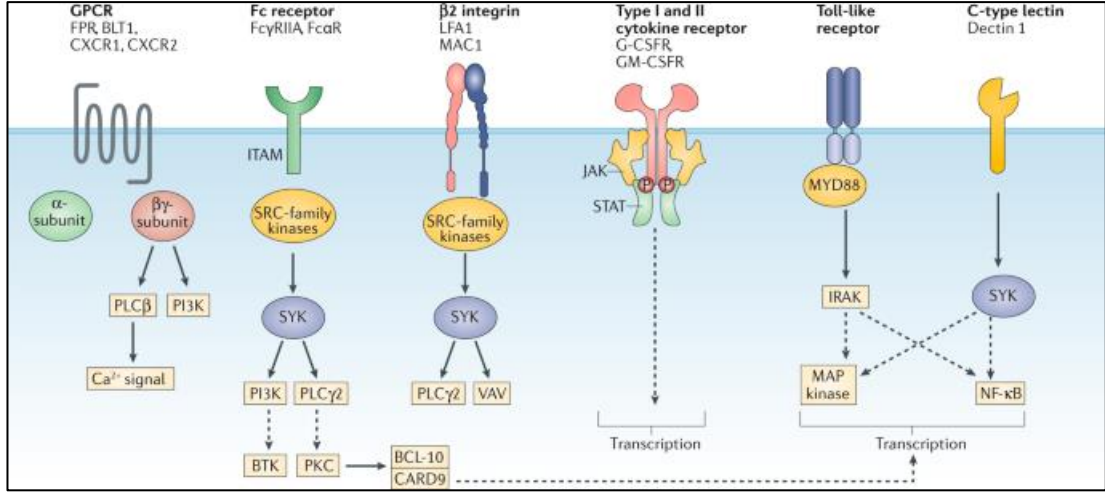
gelecek kemotaksisi tetikleyici sinyallere yanıt verebilme kapasitesine sahip olur ve enflamasyona daha kuvvetli bir yanıt oluşturmak için sitokin salgılama potansiyelini güçlendirir [Miralda vd., 2017].

2.4. Nötrofil Reseptörleri

Nötrofiller, transendotel migrasyonda (TEM) rol alan integrin ve selektinler ile istilacı patojenlerin tespiti ve etkisizleştirilmesinde rol alan patojen tanıyıcı reseptörler (PRR), opsonin reseptörleri ve G-protein bağlı reseptörlerden oluşan temelde 2 farklı grup yüzey reseptörü ifade eder (Şekil 2.1).

2.4.1. Transendotel Migrasyon Reseptörleri

Hazırlanma aşamasını tamamlayan nötrofiller enflamasyon bölgesinden gelen kemotaksis sinyaline yanıt olarak, kan dolaşımından çıkarak endotel dokuya geçiş yaparlar. Nötrofillerin transendotel migrasyonu olarak adlandırılan bu olayda selektin ve integrinler görev alır. Enflamasyon bölgesindeki endotel hücreler (E-Selektin), plateletler (P-Selektin) ve lökositler (L-Selektin) tarafından ifade edilen bir çeşit tek zincirli glikoprotein olan selektinler ile nötrofillerin üzerinde bulunan selektin ligandları etkileşime girerek nötrofillerin dolaşımında yavaşlamasına ve o bölgede sayılarını arttırarak transendotel migrasyonun ilk aşaması olan yuvarlanmayı (rolling) başlatmasına neden olur [Zarbock vd., 2009]. İntegrinler ise nötrofillerin enflamasyon bölgesine göçü sırasında aktif hale gelir. Alfa ve beta olarak iki parçadan oluşan integrinler nötrofillerin enfeksiyon bölgesinde endotel hücreler ile sıkı bağlantılar kurmasını sağlar. Nötrofillerde en fazla bulunan integrin tipi $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (LFA-1) kompleksidir. Ayrıca migrasyonunu tamamlayan nötrofiller sahip oldukları fibronektin gibi matris proteinlerine bağlanmalarını sağlayıcı reseptörleri sayesinde fagositoz için gerekli olan doku içindeki nötrofil hareketlerinde de görev alırlar (Şekil 2.1) [Schymeinsky vd., 2007], [Nemeth vd., 2020].



Şekil 2.1: Nötrofillerin yüzeyinde ifade edilen reseptörler ve sinyal yolları [Nemeth vd., 2020].

2.4.2. Patojen Tespit Reseptörleri

Hazırlığını tamamlamış nötrofillerin aktivasyonunda rol oynayan istilacı patojen tespitinde ve eliminasyonunda rol alan reseptörler 3 grupta incelenir. Bunlardan ilki patojen tanıyıcı reseptörlerdir (pathogen recognition receptors (PRRs)). Bu reseptörler toll-benzeri reseptörler (TLR) ve C-tipi lektin reseptörleri gibi hücre yüzeyinde ya da NOD-benzeri reseptörler (NLR) ve RIG-I-benzeri reseptörler gibi nötrofillerin sitoplazmasında bulunabilir. 2 farklı tipte moleküler paterni tanıyabilirler [Moresco vd., 2011], [Berger vd., 2012]. Bunlar istilacı mikroorganizmalardan kaynaklı karbonhidratlar (lipopolisakkaritler, LPS), peptitler (flagellin) ya da nükleik asitler (viral ya da bakteriyel DNA, RNA) gibi patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP) ya da doku hasarı ve hücre ölümünün neden olduğu istilacı mikroorganizma kaynaklı olmayan hasar ilişkili moleküler patern (DAMP) olabilir [Futosi vd., 2013].

Oponizasyon, istilacı patojenlerin immünoglobulinler (IgG vb.) ya da kompleman sistem elemanları (C3b vb.) tarafından kaplanması işlemidir. Daha sonra opsoninlenen patojenler Fc reseptörleri (immünoglobulinlerin Fc bölgesini tanıır) ya da kompleman reseptörler (CR1, CR3, CR4) gibi opsonik reseptörler aracılığıyla tanınarak nötrofiller tarafından fagositoza uğrar ve yok edilir [Bruhns P., 2012].

G-protein bağlı reseptörler N-formil metiyonin içeren bakteri peptitlerini ya da diğer hücrelerden salınan kemokin, kompleman sistem elemanları (C5), platelet aktive edici faktör gibi ligandlara bağlanabilir [Stafforini vd., 2003] [Lee vd., 2008]. GPCR-

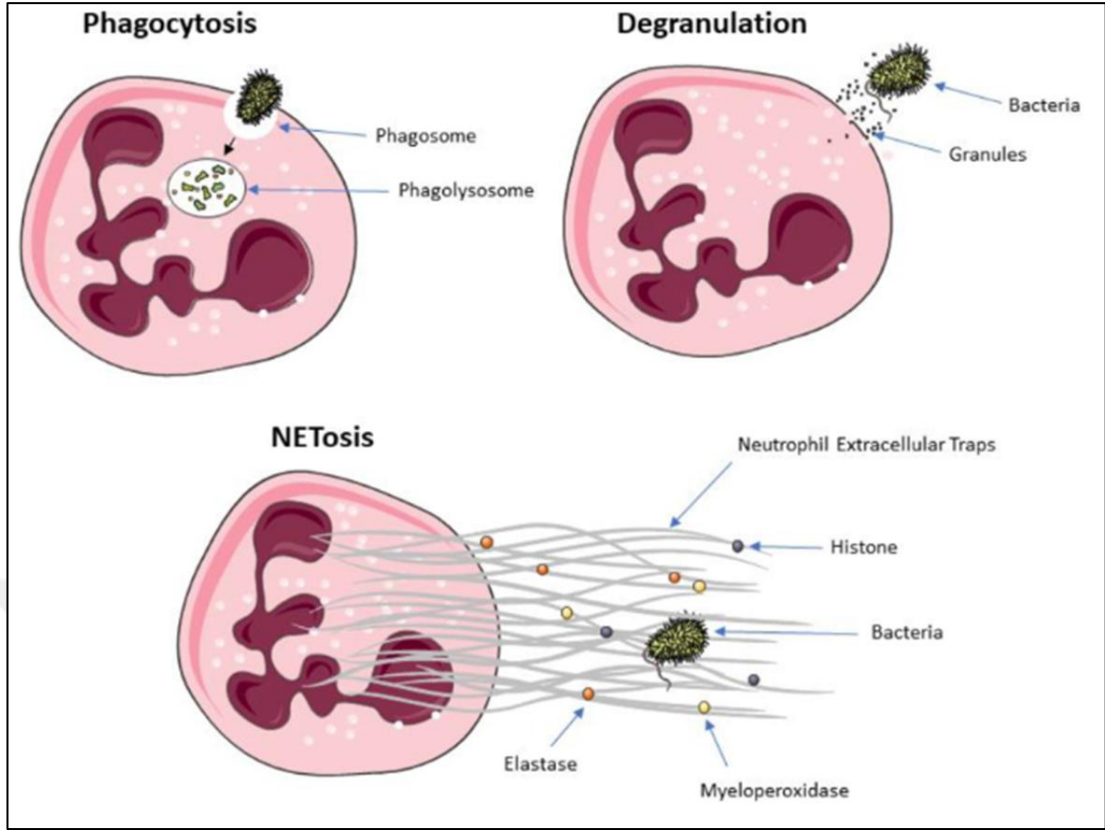
ligand etkileşimi çeşitli yollarla aktive ederek nötrofillerin kemotaksisini ya da aktivasyonunu tetikler ve istilacı patojenlerin elimine edilmesine katkı sağlar [Futosi vd., 2013]. Örneğin doku hasarı ya da enflamasyon olan bölgelerdeki endotel hücrelerden salgılanan bir kemokin olan IL-8, nötrofiller üzerinde bulunan GPCR'lerden ELR (Glu-Leu-Arg) motifine sahip CXC kemokin reseptörleri CXCR1 ve CXCR2 tarafından tanınır [Nasser vd., 2009]. Aktive olan bu reseptörler nötrofillerin enflamasyon olan bölgeye göçünü tetikler. Ayrıca aktivasyonunu tamamlayan nötrofillerin enfeksiyon bölgesinde NET oluşturarak istilacı patojenlerin yayılması engellemesinde görev alır (Şekil 2.1) [Nemeth vd., 2020].

Nötrofil aktivasyonu yalnızca reseptörler aracılığıyla gerçekleşmez. Aynı zamanda NADPH oksidaz reaksiyonu için gerekli bileşenlerin bir araya gelmesi sonucu ROS üretimiyle nötrofiller aktive olabilir. Örneğin diester phorbol 12- myristate 13-acetate (PMA) ya da ionomycin gibi bileşikler, NADPH oksidaz reaksiyonlarının hücre zarında ya da granül membranlarında gerçekleşerek hücre içi veya dışı ROS üretimini tetikleyebilir [Lundqvist vd., 1996], [Dahlgren vd., 1999].

2.5. Nötrofillerin Savunma Mekanizmaları

2.5.1. Fagositoz

Fagositoz, nötrofillerin opsonik reseptörlere bağımlı ya da bağımsız bir şekilde patojenleri tanıdıktan sonra hücre şekillerini değiştirerek patojeni yutup, içselleştirdikten sonra sindirerek etkisiz hale getirmesidir [Nordenfelt vd., 2011]. Nötrofiller hem opsoninlenmiş hem de opsoninlenmemiş patojenleri tanıma kapasitesine sahiptir. Patojenler nötrofiller tarafından tanıdıktan sonra fagositik vakuollere alınır ve ardından fagozom gelişimi tamamlanır. Fagozomların oluşabilmesi için NADPH oksidaz aktivasyonu ya da primer granüllerin fagozomla birleşmesi gereklidir (Şekil 2.2) [Nordenfelt vd., 2011], [Gierlikowska vd., 2021]. Bu sayede hem üretilen ROS hem de primer granüllerde bulunan antimikrobiyal içerik içselleştirilen patojenlerin sindirilmesi ve eliminasyonunda kullanılır. Fagositozun ardından nötrofiller olası bir nekrotik ölüm sonucu ortama patojenden kalan sitotoksik kalıntıların yayılmasını engellemek için programlı olarak apoptoza giderler [Fox vd., 2010].



Şekil 2.2: Nötrofillerin patojenler ile savaşta kullandığı savunma mekanizmaları. Nötrofillerin istilacı patojenlere karşı kullandığı üç temel bağışıklık sistemi mekanizması fagositoz, degranülasyon ve nötrofil hücre dışı tuzak oluşumu [Gierlikowska vd., 2021].

2.5.2. Degranülasyon

Nötrofiller granüllerinde bulundurdukları antimikrobiyal içeriklerini ekzositoz yoluyla hücre dışına atarak patojenleri öldürebilir ya da barınmaları için gerekli ortamı bozabilir. Degranülasyonda ilk olarak granüller sitoplazmada hareket ederek hücre zarına bağlanır. Ardından granül membranları hücre zarıyla birleşerek içerisindeki protein ve peptitleri hücre dışına boşaltır (Şekil 2.2) [Lacy P., 2006] [Gierlikowska vd., 2021]. Moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen degranülasyonda beta-arrestinler, Rho guanozin trifosfat Rac2, çözümlü (soluble) NSF bağlayıcı protein (SNAP) reseptörleri gibi farklı hücre içi sinyal yollarının rol aldığı bilinmektedir [Lacy P., 2006]. Anti mikrobiyal özelliğe sahip olmasına rağmen kontrol edilemeyen degranülasyon doku hasarına sebep olabilmektedir.

2.5.3. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları Oluşumu (NETosis)

NET oluşumu diğer fagositoz ve degranülasyondan daha sonra keşfedilen hücre dışı patojenlerin etkisiz hale getirildiği bir nötrofil savunma mekanizmasıdır. İlk kez 2004 yılında Brinkmann ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [Brinkmann vd., 2004]. NETosis nötrofillerin DNA'larını ve DNA bağlanmış histonlar ve granül kaynaklı antimikrobiyal proteinlerinin hücre dışı ortama salınması ile karakterizedir. Bu şekilde ağ benzeri bir yapı oluşturan NET'ler patojenlerin fiziksel olarak yayılmasını engellerken aynı zamanda antimikrobiyal özelliği ile patojenleri elimine eder (Şekil 2.2) [Brinkmann vd., 2004], [Gierlikowska vd., 2021].

2.5.3.1. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakların Keşfi

Nötrofillerin granüllerinde bulunan ve çeşitli bakterilerin virülans faktörlerini etkisiz hale getirdiği bilinen nötrofil elastaz enzimini mikroskopi çalışmaları ile inceleyen Brinkmann ve arkadaşları, hücre dışında bulunan nötrofil elastaz enziminin hücre dışında atılmış DNA ve ona bağlı histonlar ile birlikte konumlandığını keşfederek ilk kez bir çekirdek materyalinin enfeksiyonda aktif olarak rol aldığını göstermiştir [Brinkmann vd., 2004].

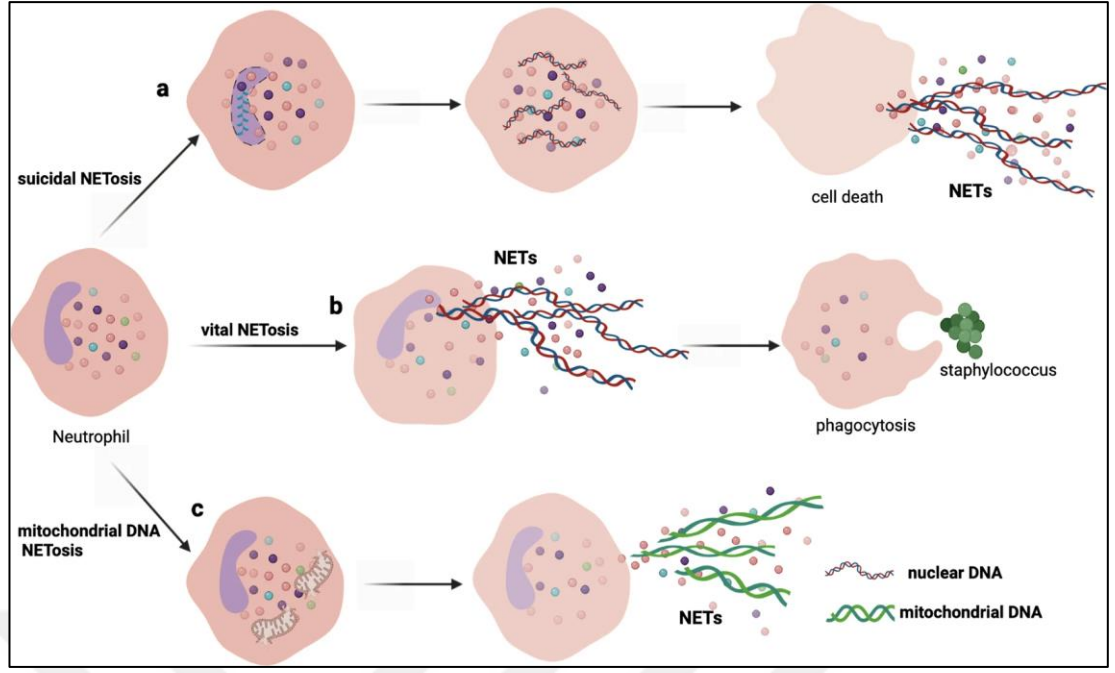
2.5.3.2. NET'lerin Yapısı ve Bileşenleri

NETosis hücre dışına atılmış ağ benzeri DNA yapıları ile karakterize edilmiş nötrofillere özgü programlanmış bir ölüm mekanizmasıdır [Fuchs vd., 2007]. NET olarak adlandırılan bu ağsı yapılar hücre dışı kromatin fiber yapılarıdır. Yaklaşık olarak 15-17 nm çapında DNA ve ona bağlı histon proteinlerinden oluşurlar [Brinkmann vd., 2004]. Histonlara ek olarak granüllerin yapısında bulunan ve NETosis süresince DNA'ya bağlanan antimikrobiyal veya inflamatuvar özelliklere sahip peptit, protein ve enzimler de NET yapısında bulunur. Bunlar arasında nötrofil elastaz, katepsin G, PR3, pentaxrin 3, defensinler, katelisidin LL-37, MPO gibi birçok molekül sayılabilir. NET yapıları üzerine yapılan erken çalışmalarda yalnızca bazı temel histon ve granül proteinlerinin (NE, CG ve MPO) bu mekanizmaya katıldığı bulunmuştur. İlerleyen çalışmalarda ise NET proteomunun daha geniş bir yelpazeye sahip olduğu ve farklı uyarılara yanıt olarak değişkenlik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır [Li vd., 2020]. NET yapılarında bulunan proteinlerin yaklaşık olarak

%70'i histonlar, %30'u ise granül proteinlerden oluşmaktadır ve ayrıca bu proteinlerin tamamı katalitik aktivitelerini korurlar [Li vd., 2020], [Dabrowska vd., 2016].

2.5.3.3. NETosis Mekanizmaları

İlk NETosis araştırmalarında hücre dışına atılan DNA'nın apoptoz ya da nekroz gibi hücre ölüm mekanizmalarının ardından ortama salındığı düşünölmüştür. Yapılan sonraki çalışmalarla, NET oluşumunun diğer ölüm mekanizmalarından bağımsız olarak yıkıcı (suicidal) NETosis ve yaşamsal (vital) NETosis olarak bilinen 2 farklı mekanizma ile ortaya çıktığı gösterilmiştir [Fuchs vd., 2007], [Steinberg vd., 2007], [Yipp vd., 2013]. Bunlara ek olarak mitokondriyal DNA da bazı durumlarda NET oluşumunda rol alabilir (Şekil 2.3) [Yousefi vd., 2009], [Zhu vd., 2021]. Bu mekanizmalar için gerekli olan nötrofil aktivasyonu ve bazı moleküler yapılar ortak olsa da işlemin süresi, DNA'nın kaynağı, NET proteomu ve hücrelerin NETosis sonucundaki canlılık durumu gibi farklılıkları vardır [Zhu vd., 2021].



Şekil 2.3: Nötrofil hücre dışı tuzak oluşumunun 3 farklı türü: yıkıcı (suicidal), yaşamsal (vital) ve mitokondriyal NETosis [Zhu vd., 2021].

2.5.3.3.1. Yıkıcı (Suicidal) NETosis

Yıkıcı NETosis başlangıcı için en önemli olay bazı granül proteinlerinin sitoplazmaya salınmasıdır. Burada azurofilik yani primer granüller önemli rol oynar. Bu granüllerde azurozom adı verilen 8 farklı proteinden oluşan bir protein kompleksi bulunur. Bu komplekste NE, CG ve azurosidin gibi korunmuş serin proteazlar ile MPO bulunur [Metzler vd., 2014]. Nötrofillerde çeşitli moleküller ile uyarıldıktan sonra ROS üretimi başlar. Üretilen ROS molekülleri ise azurozom kompleksinin bozulmasına ve serin proteazlar ile MPO'nun granüllerden sitoplazmaya geçişine neden olur [Metzler vd., 2014], [Papayannopoulos vd., 2010]. Ardından başta NE olmak üzere serin proteazlar önce hücre iskeletini, çekirdek zarını ve son olarak DNA katlanmasına yardımcı olan histon ve laminleri parçalar [Metzler vd., 2011], [Metzler vd., 2014]. Bu sırada peptidil-arjinin deaminaz 4 (PAD4) enzimi sitoplazmadan çekirdeğe gider ve histon sitrülasyonunu başlatır. Bu olay kromatin açılmasını hızlandırır [Vorobjeva vd., 2020]. Sitrülasyona ek olarak histon asetilasyonu da yıkıcı NETosis sırasında görülmesine rağmen rolü tam olarak açıklanamamıştır [Ravindran vd., 2019]. Sitrülinlenmenin ve serin proteazlar aracılığıyla gerçekleşen nükleer lamina parçalanması ve kromatin açılmasının ardından kromatin sitoplazmaya salınır. Burada

elektrostatik çekiminden dolayı daha önce sitoplazmaya salınmış olan birçok granül kaynaklı protein kromatin halindeki DNA'ya bağlanır. Yıkıcı NETosis'in son adımı olarak gasdermin D protein (GSDMD) aracılığıyla kromatinlerin hücre dışına salınabileceği hücre zarı porları oluşturulur [Vorobjeva vd., 2020]. Ayrıca apoptoz ve nekrozun aksine GSDMD nötrofil elastaz yardımıyla aktive edilir. Sonuç olarak oluşan por yapılarında dekondanse kromatin ve ona bağlı histon ve granül proteinleri hücre dışı ortama saçılır ve 2-4 saat süren bu mekanizma nötrofilin ölümü ile sonuçlanır (Şekil 2.3) [Vorobjeva vd., 2020] [Zhu vd., 2021].

2.5.3.3.2. Yaşamsal (Vital) NETosis

Yıkıcı NETosis aksine nötrofillerin yaşamlarını devam ettirebildikleri ve fonksiyonel diğer özelliklerini korudukları farklı bir NET oluşturma mekanizması daha vardır [Yousefi vd., 2020]. Vital ya da yaşamsal NET oluşumu olarak adlandırılan 5-60 dakika süren bu mekanizma, veziküller yardımı ile DNA'nın hücre dışına atılması ile karakterizedir [Buhr vd., 2016]. Vital NET oluşumu sonrası hücre zarı bütünlüğünü korur. DNA kargosu taşıyan veziküller sitoplazmadan taşınarak hücre zarına bağlanır. Burada gerçekleşen füzyonun ardından DNA hücre dışına atılır. Bu işlem sonucunda hücre yaşamını devam ettirir ve hücre tüm DNA'sını kaybedene kadar tekrarlanabilir. Vital NET oluşumu sırasında hangi granül proteinlerinin DNA'ya nasıl bağlandığı halen bilinmemektedir. En kabul gören hipotez ise DNA hücre dışına atıldıktan sonra degranülasyon ile atılan proteinlerin bağlanması yoluyla olabileceğidir [Pilszczek vd., 2010], [Yipp vd., 2012], [Buhr vd., 2016]. Vital NET oluşumunun bir diğer yolu ise mitokondriyal DNA'nın hücre dışına atılmasıdır. Böylece histon bulunmayan mitokondriyal DNA veziküller yardımıyla hücre dışına atılabilir [Yousefi vd., 2009]. Nötrofil hücreleri tamamen farklılaşmış hücreler oldukları için transkripsiyon aktiviteleri oldukça düşüktür. Bu yüzden bazı DNA parçaları hücre dışına atılsa da nötrofillerin hala yaşamsal faaliyetlerini yerine getirdikleri ve fagositoz ve degranülasyon gibi efektör fonksiyonlara sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 2.3) [Remijsen vd., 2011] [Zhu vd., 2021].

2.5.3.3.3. NETosis Uyarıları

Nötrofiller yüzeylerinde G-protein bağımlı reseptörler, Fc reseptörler, adhezyon reseptörleri, sitokin reseptörleri ya da patojen tanıma reseptörleri gibi onlarca çeşit reseptörü bulundurur. Bu kadar fazla reseptöre sahip olmaları ile doğru orantılı olarak da farklı patojenleri tanıyıp onlara karşı yanıt verme kapasitesine sahiptirler. Patojenlerden gelen sinyalleri tanıyan nötrofiller sinyalin türüne ve yoğunluğuna göre NETosis ya da diğer savunma sistemi yollarından birini devreye alır **[Futosi vd., 2013]**. NET oluşumunda doğal ya da sentetik ajanlar, proinflamasyon ve hem akut hem de kronik inflamasyonda rol alan moleküller görev alabilir. Bunlar arasında patojen kaynaklı bakteriyel yapılar ve moleküller (LPS), mantar bileşenleri (beta glukon) ya da viral partiküller sayılabilir **[Hoppenbrouwers vd., 2017]**. Ayrıca interferonlar (IFN- α,β,γ), kemokinler (CXCL8), sitokinler (IL1 β), büyüme faktörleri (G-CSF) gibi immün yapılar da nötrofillerde NET oluşumunu başlatabilir **[Hoppenbrouwers vd., 2017]**, **[Giaglis vd., 2016]**, **[Garcia-Romo vd., 2011]**. Nötrofiller çok farklı uyarılar ile tetiklenebilmesine rağmen benzer uyarılara farklı derecede reaktivite gösterebilir. Örneğin dolaşıma yeni salınan genç nötrofillerin (CXCR2 ve CD62L yüksek ifade edilen) kısmen daha yaşlı nötrofillere (CXCR2 düşük ve CXCR4 yüksek ifade edilen) göre NET oluşturma kapasitesinin daha yüksek olduğu ve NET'lere bağlı protein içeriğinin daha zengin olduğu görülmüştür **[Adrover vd., 2019]**, **[Adrover vd., 2020]**.

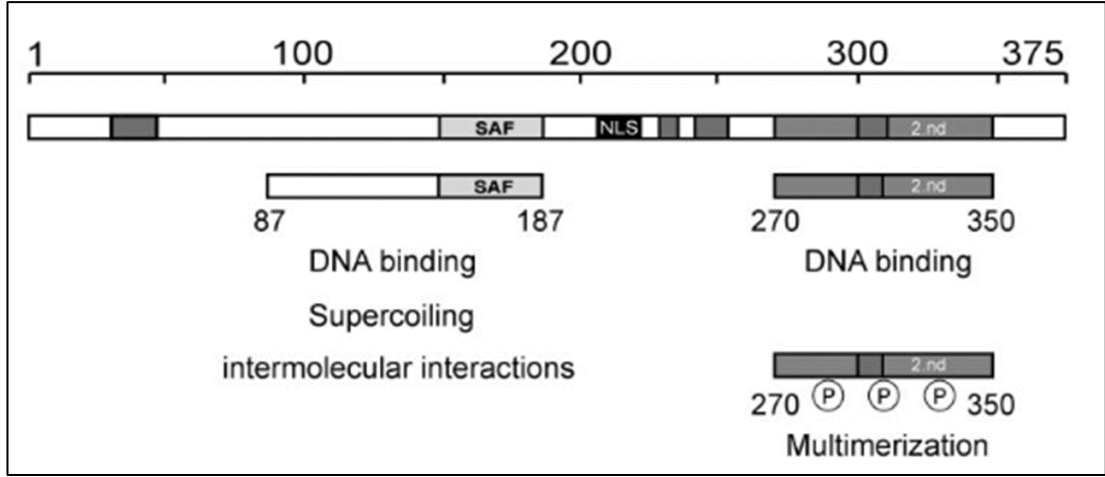
3. DEK PROTEİNİ

3.1. DEK Proteini ve Yapısı

DEK geni ilk kez akut miyeloid lösemi (AML) hastası olan Derek K.'de 1992 yılında keşfedilmiştir [von Lindern vd., 1992] ve hasta adının baş harflerini içerecek şekilde isimlendirilmiştir. Bu hastada, *DEK* ve *CAN* (*NUP214*) geninin t(6;9) kromozom translokasyonu sonucu füzyon (*DEK-CAN*) oluşturduğu gösterilmiştir [Soekarman vd., 1992]. Bu füzyon geninin ürünü olarak oluşan kimerik proteinin birçok kan hücresinde translasyonu arttırdığı ve hücre bölünmesi ve farklılaşma gibi olaylarda rol aldığı görülmüştür [Sanden vd., 2013]. Tespit edilen tüm AML vakalarının yaklaşık %1'inde bu füzyona rastlanmaktadır ve lösemi için bir belirteç olarak kullanılmaktadır [Oancea vd., 2010], [Sandahl vd., 2014]. Bu nedenle DEK proteini bir proto-onkogen olarak tanımlanmaktadır.

Bir histon olmamasına rağmen DEK, kromatine bağlanan bir çekirdek proteindir. Bilinen bir enzimatik aktivitesi yoktur. *C. elegans* ve mayalar hariç tüm yüksek ökaryotlarda evrimsel açıdan sıkı bir şekilde korunmuştur [Waldmann vd., 2004]. Hücredeki ifadesi hücre büyümesine bağlıdır. Genellikle bölünen hücrelerde ifadesi artarken, hücreler terminal farklılaşmasına yaklaştıkça ifadesi azalır [Ageberg vd., 2006], [Khodadoust vd., 2009], [Waldmann vd., 2004]. Sağlıklı dokularda az miktarda ifade edilir fakat lösemi, kolon, karaciğer ve meme gibi kanser türlerinde ifadesi anlamlı biçimde artış gösterir [Ishida vd., 2020], [Yu vd., 2016], [Carro vd., 2006].

DEK 43 kDa ağırlığında bir proteindir ve 375 amino asitten oluşur (Şekil 3.1) [Oancea vd., 2010], [Böhm vd., 2005]. Genellikle çekirdekte bulunur. *DEK* geninin bilinen iki farklı transkript varyantı vardır. Üzerine en fazla araştırma yapılan varyant tam transkript olan DEK isoform-1'dir (DEK1). Alternatif kırılma sonucu ortaya çıkan DEK isoform-2 (DEK2) varyantında ise 3. ekzon (49.-82. amino asitler arası) bulunmamaktadır ve protein 341 amino asit uzunluğundadır [Web1, 2024].



Şekil 3.1: DEK proteinin yapısı ve fonksiyonel bölgeleri [Böhm vd., 2005].

DEK proteininin SAP box DNA bağlanma bölgesi vardır [Aravind and Koonin, 2000]. SAP box bölgesi DEK'in diğer proteinler ile homoloji gösterdiği tek bölgedir, fakat diğer proteinlerden farklı olarak SAP box bölgesi proteinin ortasında bulunur (Şekil 3.1) [Böhm vd., 2005], [Devany vd., 2008]. Ayrıca N-terminal bölgesinde sözde-SAP-bölgesi (SAF-A/B, Acinus, and PIAS) de bulunur ve DEK'e farklı özellikler katar [Devany vd., 2008]. DEK proteininin NMR görüntüleri incelendiğinde bu sözde-SAP-bölgesinin 3 α -heliks (1-3), SAP bölgesinin 2 α -heliks (4-5) yapısı oluşturarak küresel bir proteine benzediği görülmektedir [Devany vd., 2008]. Ayrıca sözde-SAP-bölgesi protein dizisi olarak olmasa da şekil ve yapı olarak SAP bölgesine son derece benzerlik göstermektedir ve DNA'ya bağlanma kapasitesine sahiptir. 5 numaralı heliksin protein-protein etkileşimlerine katıldığı bilinmektedir [Devany vd., 2008]. DEK proteininin DNA ve kromatine bağlanmasında görev alan SAP motifine ayrıca 40'tan fazla proteinin bağlanabildiği ortaya çıkarılmıştır [Aravind and Koonin, 2000]. Bu bölgelere DEK aracılığıyla bağlanan proteinler DNA tamiri, transkripsiyon, replikasyon ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi olaylarda rol alabilirler [Aravind and Koonin, 2000]. DEK'in 309–375 amino asitlerinde yer alan C terminal bölgesi de 3'lü α -heliks oluşturmaktadır [Gajiwala and Burley, 2000]. Bu bölge DNA'ya bağlanma ve multimerizasyonda görev alır (Şekil 3.1) [Kappes vd., 2004b], [Böhm vd., 2005]. Bu bölgede ayrıca birçok CK2 fosforilasyon bölgesi bulunur. DEK proteininin fosforilasyonu kromatine bağlanma kapasitesini düşürürken, proteinin dimerize olmasını artırır (Şekil 3.1) [Kappes vd., 2004a], [Kappes vd., 2004b], [Böhm vd., 2005].

Sözde-SAP ve SAP motiflerinin oluşturduğu özel yapı DEK'e farklı DNA yapılarına spesifik olarak bağlanma kapasitesi kazandırır. Örneğin DEK proteini B DNA formasyonu dışındaki DNA'lara ve DNA süper-döngülerine bağlanabilir [Waldmann vd., 2003], [Böhm vd., 2005]. Ayrıca dairesel DNA'ya bağlanarak pozitif yönlü süper döngüler oluşturabilir [Waldmann vd., 2002]. DEK proteininin ayrıca sekans spesifik bağlanma özelliği de vardır. DEK proteininin, HIV-2 (human immunodeficiency virus) enhancer'ının bir regülatörü olan peri-Ets bölgesine ve yine peri-Ets bölgesine DNA sekansı olarak benzeyen MHC-II sınıfı promotör bölgelerine bağlanma kapasitesi vardır [Fu vd., 1997], [Adams vd., 2003].

DNA bağlanma ve kromatin yeniden düzenlenmesi fonksiyonları aynı zamanda DEK'in histon şaperon özelliği ile ilgilidir. İnsan ve farede DEK proteini, H3.3 regülasyonuna katılır. Benzer özelliği *D. melanogaster*'de gösteren DEK proteini histon H3.3 şaperonu olarak görev alır [Sawatsubashi vd., 2010]. DEK ifadesindeki değişimler ile histon H3'deki bazı post-translasyonel modifikasyonlar arasında (H3K9me3 ve H3 asetilasyonu) bağlantı olduğu ortaya çıkarılmıştır [Ivanauskiene vd., 2014]. Bu DEK kaynaklı H3 modifikasyonları sonucunda ise DNA tamiri, hücre bölünmesi, immün yanıtı ve migrasyon gibi farklı hücresel yollar etkilenebilir.

3.2. Endojen DEK Proteini ve Görevleri

Çoğunlukla çekirdekte bulunan DEK proteininin proliferasyon, farklılaşma, hücre ölümü, DNA tamiri, RNA işlenmesi ve senesens de dahil olmak üzere pek çok fonksiyonu olduğu gösterilmiştir [Waldmann vd., 2004]. DEK proteini hızlı bölünen hücrelerde farklılaşmış hücelere oranla daha fazla ifade edilir [Kappes vd., 2011]. Çeşitli meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda DEK aşırı ifade edildiğinde proliferasyon hızının arttığı, shRNA ile DEK ifadesi baskılandığında ise proliferasyonun azaldığı görülmüştür [Wise-Draper vd., 2008]. Benzer şekilde aşırı DEK ifadesinin keratinositlerde farklılaşmayı azalttığı bulunmuştur [Vinnedge vd., 2011], [Wise-Draper vd., 2009]. Hematopoetik kökenli hücrelerde DEK proteini hematopoetik kök hücrelerinin devamlılığına katkı sağlar. Ayrıca DEK'in baskılanmasının bu hücrelerde koloni oluşturma kapasitesini azalttığı görülmüştür [Broxmeyer vd., 2012]. Hem aşırı DEK ifadesinin keratinosit ömrünü uzatması hem de replikasyonun neden olduğu yaşlanmanın (replikatif senesens) ifadesini azaltması,

DEK'in yaşlanmada da görevli olabileceğine dair kanıtlar sunar [**Wise-Draper vd., 2005**].

DEK'in çeşitli mekanizmalar ile apoptozda rol alabileceği düşünülmektedir. Örneğin HeLa hücre hattında yapılan çalışmalarda DEK ifadesinin baskılanmasının p53 stabilizasyonunu arttırarak p53 ilişkili genlerin ifadesini arttırdığı ve hücrenin apoptoza gitmesine neden olduğu gösterilmiştir [**Wise-Draper vd., 2006**]. DEK'in apoptoza etkisi p53 ile sınırlı değildir. Melanoma hücrelerinde DEK ifadesinin baskılanması p53'ten bağımsız bir şekilde bir anti-apoptotik protein olan MCL-1' in ifadesini azaltır. Böylece melanoma hücrelerinin apoptoza gitmesine neden olur [**Khodadoust vd., 2009**]. Ayrıca DEK ifadesinin azalması sonucunda hücrelerin apoptoz tetikleyici bazı ajanlara karşı daha duyarlı hale gelmesi de DEK'in anti apoptotik bir rolü olduğunu kanıtlar niteliktedir [**Khodadoust vd., 2009**], [**Kappes vd., 2008**]. Yine DEK proteini ifadesinin baskılanması, DNA tamir mekanizmalarının düzgün çalışmamasından kaynaklı DNA hasar yanıtını arttırarak genotoksik ilaçların etkilerini arttırır [**Kavanaugh vd., 2011**]. Bu durum DEK'in DNA tamiri ve kromatin düzenlenmesindeki görevine bir örnektir.

3.3. Salgılanan DEK Proteini ve Görevleri

DEK proteini bir çekirdek proteini olmasına rağmen bazı post-translasyonel modifikasyonlar DEK'in kromatine olan afinitesini düşürerek kromatinden ve dolayısıyla çekirdekten ayrılmasına neden olabilir. Yapılan çalışmalar fosforillenmiş DEK'in hematopoetik hücrelerden serbest formda salgılandığını göstermiştir [**Saha vd., 2013**]. Ayrıca, IL-8 ile uyarılan monosit türevli makrofajlar aktif olarak CK2 bağımlı fakat golgi aracılığıyla olmamasına rağmen eksozomlar aracılığıyla aktif olarak DEK salgılayabilir [**Mor-Vaknin vd., 2006**]. Apoptoza giden T-hücreleri ise Poly-ADP ribozil modifikasyonu nedeniyle pasif olarak DEK salgılayabilir [**Kappes vd., 2008**]. Genellikle otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilen salgılanmış yani hücre dışı DEK ve DEK oto-antikorları JIA hastalarının eklem sıvılarında tespit edilmiştir [**Mor-Vaknin vd., 2006**], [**Mor-Vaknin vd., 2011**], [**Mor-Vaknin vd., 2017**]. Salgılanan DEK ayrıca nötrofiller, sitotoksik T-hücreleri ve NK (natural killer, doğal katil) hücrelerinin kemotaksisine neden olur [**Mor-Vaknin vd., 2006**], [**Mor-Vaknin vd., 2011**]. DEK proteini, high mobility group box 1 (HMGB1) gibi salgılandıktan sonra parakrin aktivite gösterebilen 2 çekirdek proteininden birisidir [**Mor-Vaknin**

vd., 2006], [Mor-Vaknin vd., 2011], [Dong vd., 1998]. Elektrostatik yükü ve hidrofilitik özelliği nedeniyle hücre içine heparan sülfat proteoglikanlar (HSPGs) ile alınır ve hücre içine alındıktan sonra nükleer lokalizasyon sinyali sayesinde çekirdeğe giderek DNA tamiri ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi fonksiyonlarını yerine getirebilir [Capitano vd., 2017], [Saha vd., 2013].

DEK proteininin tıpkı CXCL2 ve CXCL8 gibi CXCR2'ye bağlanabilen miyelosupresif kemokinlerde olduğu gibi Glu-Leu-Arg (ELR) motifi taşıdığı tespit edilmiştir [Wise-Draper vd., 2009]. Bu bilgiyle bağlantılı bir şekilde hücre dışına salgılanmış DEK proteininin CXCR2, HSPGs ya da Gai sinyal yolları aracılığıyla hedef hücrelerinde proliferasyonu bloke ettiği görülmüştür [Capitano vd., 2019]. Ayrıca DEK'in proliferasyonu inhibe etmek için hücre içine alınmaya ya da çekirdeğe göçüne ihtiyaç bulunmamaktadır. İlgili çekici olarak, salgılanan DEK'in ERK1/2, p38 MAPK, AKT gibi CXCR2 alt sinyal yollarında fosforilasyona neden olarak hematopoetik kök hücre sayısını arttırdığı buna karşın öncül kan hücrelerinin sayısını azalttığı gösterilmiştir [Capitano vd., 2019], [Wilcher vd., 2023].

Dek geni silinmiş farelerde yapılan bir transkriptom çalışmasında rekombinant fare DEK (rfDEK) proteini ile muamelenin *Tnf* ve *CXCL10* gibi bazı inflamasyon bağlantılı sitokinlerin mRNA ifadesinde artışa neden olduğu bulunmuştur [Vinnedge vd., 2011]. Yine aynı çalışmada, rfDEK muamelesinin hematopoetik kök ve öncül hücrelerde kemotaksis ve migrasyon ile bağlantılı genlerin ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir. LSK (Lineage-marker-, Sca-1+ ve c-Kit+) tüm hücre tiplerinde (uzun ve kısa süreli hematopoetik kök hücreler ve multipotent öncül kan hücreleri) rfDEK'e doğru konsantrasyon bağımlı kemotaksis olduğu; bu kemotaksisin CXCR2 ile ilişkili olduğu ve anti-CXCR2 antikoru ve Gai inhibitörünün kemotaksisi inhibe ettiği gösterilmiştir [Catlin vd., 2013]. Yapılan tüm bu çalışmalar salgılanan hücre dışı DEK'in hematopoetik kök ve öncül hücreleri CXCR2 yoluyla kontrol eden ve düzenleyen proinflamatuvar bir sitokin ya da kemokin olabileceğini göstermektedir [Capitano vd., 2019], [Capitano vd., 2022].

3.4. DEK ile İlişkili Hastalıklar

Yukarıda değinilen pek çok hücresel süreçte rol alan DEK proteinin fonksiyonunda ya da regülasyonunda meydana gelebilecek sorunlar başta kanser ve otoimmün

hastalıklar olmak üzere bazı hastalıklarla ilişkilendirilmektedir [von Lindern vd., 1999]. Örneğin AML, glioblastoma ve melanomada ya da mesane, meme, kolon ve karaciğer kanserinde aşırı DEK ifadesi kötü prognoz, terapiye karşı direnç, agresif tümör gelişimi ve metastaz ile ilişkilendirilir [Riveiro-Falkenbach vd., 2010], [Yang vd., 2021]. Kansere ek olarak sistemik lupus eritramatozus (SLE, Kelebek Hastalığı) ve JIA gibi otoimmün bozukluklara sahip hastalarda DEK oto-antikörlerinde artış görülür [Mor-Vaknin vd., 2011], [Wichmann vd., 2000]. Ayrıca bu hastalarda hücre dışına salgılanan DEK, nötrofiller, T-hücreleri ya da NK hücrelerinin kemotaksisini tetikleyerek immün reaksiyon oluşmasına neden olur [Mor-Vaknin vd., 2011]. Ayrıca detayları hala tam olarak bilinmemesine rağmen DEK proteininin Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol aldığı bilinmektedir [Rodriguez-Rodriguez vd., 2024]. DEK'in HIV'in yaşam döngüsünü ve enfeksiyonun ilerlemesini HIV entegraz enzimi ile girdiği etkileşim sonucu etkilediği düşünülmektedir [Pease vd., 2015].

3.5. DEK ve İnflamasyon

Otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve tümör oluşumundaki etkileri incelendiğinde DEK'in inflamasyon ile ilişkili olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca DEK ifadesinin ve salgılanmasının inflamatuvar ajanlar ile arttığı buna karşılık immün baskılayıcı ilaçlar ile azaldığı görülmüştür [Mor-Vaknin vd., 2006]. İnflamasyon arttırıcı beslenme diyetine sahip farelerde ve yine hava yolu inflamasyonuna neden olan parçacıklarla *in vitro* olarak muamele edilen insan bronşiyal epitel hücrelerinde DEK ifadesinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür [İbrahim vd., 2011], [Ruzzin vd., 2010], [Kim vd., 2015]. Bu noktadan hareketle DEK ifadesindeki artışın nedenini bulmak için *DEK* geninin promotör bölgesi incelendiğinde inflamasyon ile ilişkilendirilebilecek C/EBP β , AP-1, Ets-1, NF- κ B, STAT4 ve NF-AT gibi transkripsiyon faktörlerinin bağlanma motifi bulunmuştur [Pease vd., 2015].

NF- κ B özellikle immün yanıt ve inflamasyon ile genlerin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörleri ailesi olarak tanımlanabilir. DEK'in baskılanması NF- κ B'nin daha etkin olmasına neden olur. DEK ifadesinin olmadığı (*Dek*^{-/-}) fare fibroblast hücrelerinde TNF α ile muamelenin p65'in (NF- κ B alt birimi) çekirdeğe translokasyonunu arttırdığı, dolayısıyla NF- κ B aktivitesinde ve NF- κ B hedef genlerinin ifadesinde yükseliş olduğu tespit edilmiştir [Sammons vd., 2006]. Bu durumla örtüşen bir şekilde HeLa hücrelerinde DEK ifadesi azaltıldığında I κ B α 'nin

(NF-κB inhibitörü) fosforillenip yıkılması sonucu NF-κB aktivitesinin arttığı görülmüştür. DEK'in ifadesi normal koşullarda da (aşırı ifade ya da baskılanma olmadığında) benzer şekilde IκBα degradasyonu yoluyla NF-κB aktivitesinde rol alır [Kim vd., 2010], [Liu vd., 2012]. DEK'in aşırı ifadesi ise beklendiği üzere NF-κB aktivitesini baskılayıcı etkiye sahiptir. Ayrıca DEK'in HeLa hücrelerinde TNFα muamelesi sonrasında IL-8 ve cIAP2 gibi NF-κB hedef genlerinin promotör bölgelerine p65 ile bağlandığı görülmüştür [Sammons vd., 2006].

3.6. DEK Proteininin NET Oluşumundaki Rolü

Hücre dışına salgılanan DEK'in kromatin yeniden düzenlenmesindeki rolü, histon şaperonu olarak histon H3 regülasyonu, T hücreleri, NK hücreleri ve nötrofillerin kemotaksisini tetiklemesi; IL-8 gibi kemokinlerin CXCR2'ye bağlanmasında görev alan ELR motifine sahip olması; CXCR2 aracılığıyla hücre içine alınmasa da hematopoetik kök hücre regülasyonunda rol alması, NF-κB aktivitesinde etkili olması gibi fonksiyonları göz önüne alındığında DEK'in nötrofiller ile CXCR2 aracılı bir etkileşime sahip olup olmadığı bilinmemesine rağmen NETosis ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir [Kappes vd., 2001], [Sawatsubashi vd., 2010], [Capitano vd., 2019], [Sammons vd., 2006].

Bu bilgileri destekler nitelikte, JIA fare modeli ile yapılan çalışmalarda DEK ifadesi olmayan farelerden izole edilen nötrofillerin PMA ve LPS ile uyarıldığında NET oluşturma kapasitelerinin kaybolduğu bulunmuştur [Mor-Vaknin vd., 2017]. Buna rağmen nötrofillerinin rfDEK proteini ile muamele edildiklerinde hücre içine veya sitoplazmaya girmemesine rağmen NET oluşturduğu görülmüştür [Mor-Vaknin vd., 2017]. Yine aynı çalışmada izole edilen insan nötrofillerinin DEK'i bloke eden DEK aptamerleri (DTA-64) ile muamele edildiğinde NET oluşturma kapasitesini kaybettiği görülmüştür [Mor-Vaknin vd., 2017]. Buna rağmen halen rekombinant insan DEK proteininin tek başına NET oluşturma kapasitesine dair bir bilgi yoktur. Yapılan bir diğer *in vivo* çalışmada ise astımda DEK'in yüksek miktarlarda ifade edildiği ve DEK'i hedefleyen aptamer DTA-64'ün ve DEK'i doğrudan hedefleyen miRNA-181b-5p'nin astımın neden olduğu enflamasyonu azalttığı ve hava yollarını tekrar düzenlediği görülmüştür [Song vd., 2022]. Son olarak, yapılan fosfoproteomik analizlerde PMA, ionomycin ve monosodium urate ile uyarılan nötrofillerde gelişen NETosis'te ortak

olarak farklı regüle edilen fosforilasyon bölgeleri incelendiğinde de DEK proteinine rastlanmıştır [**Zhu vd., 2019**].



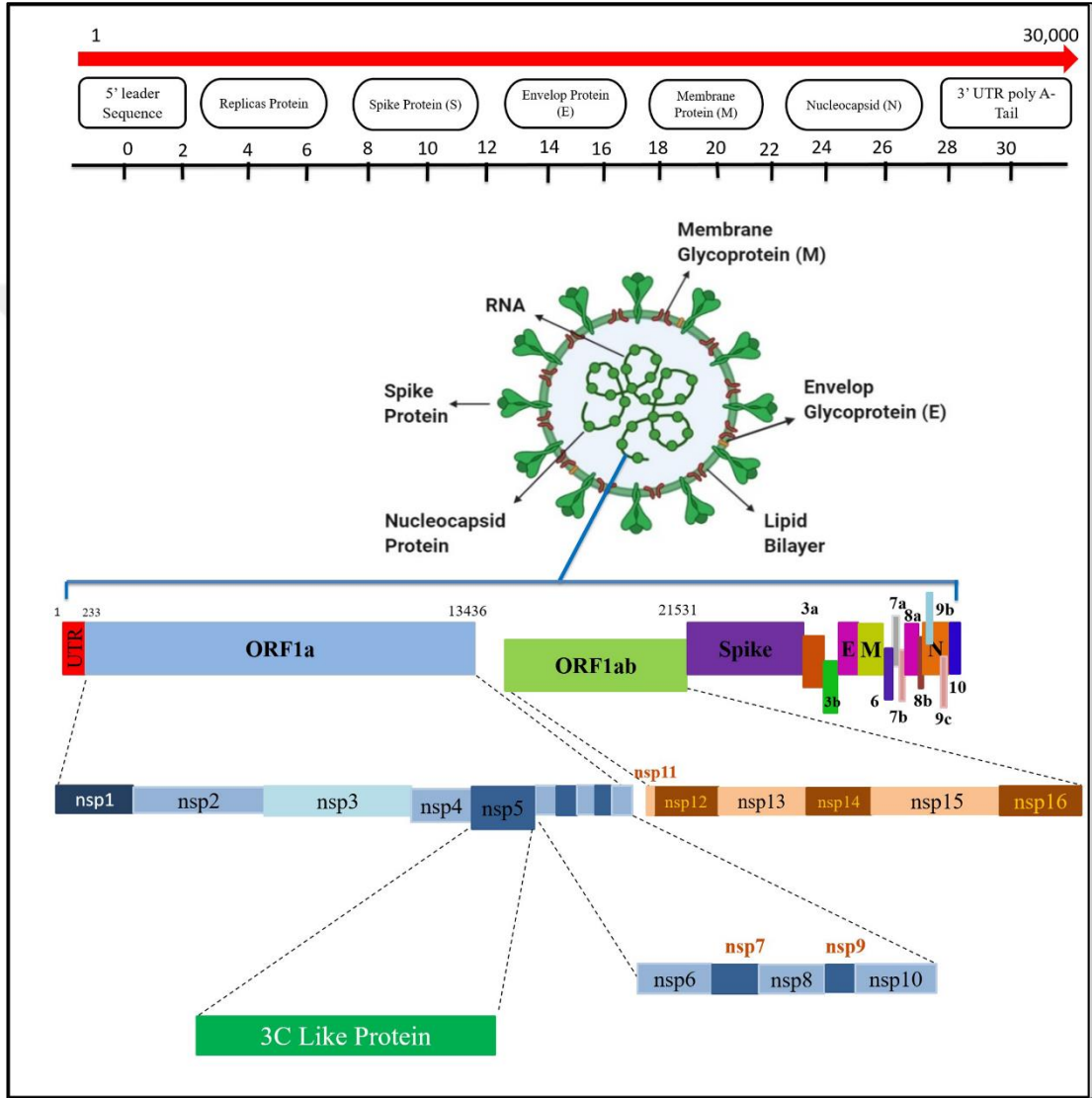
4. KORONA VİRÜS HASTALIĞI (COVID-19)

2020 yılının mart ayında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) SARS-CoV-2 enfeksiyonu kaynaklı korona virüs hastalığını pandemi olarak ilan etti. Bu durum influenza virüsünün 1918’ de neden olduğu H1N1 pandemisinden sonraki 5. pandemi ilanıydı [Liu vd., 2020]. Bilim insanları 2019 yılı aralık ayında ilk kez Çin’in Wuhan kentinde kaynağını tanımlayamadıkları pnömoni vakalarına rastlandığını yayınladılar. Bundan yaklaşık 3 ay sonra Şubat 2020’de ise bu rahatsızlıkların kaynağının yarasalardaki koronavirüsler ile ilişkili olduğu tespit edildi ve neden olan virüse “şiddetli akut solunum sendromu / severe acute respiratory syndrome coronavirus – 2” ya da SARS-CoV-2 adı verildi [Liu vd., 2020], [Silva vd., 2022]. Bu virüs 2002 ve 2012 yıllarındaki sırasıyla SARS-CoV-1 ve MERS-CoV’dan sonraki 3. koronavirüs kaynaklı salgına neden olmuştur [Albright vd., 2015]. Haziran 2024 tarihi itibari ile dünya genelinde 775 milyon kişi bu virüs ile enfekte olmuş ve toplamda yaklaşık 7 milyon kişinin hayatını kaybetmesine neden olmuştur [Web2, 2024].

Koronavirüsler insanlar da dahil olmak üzere birçok memeli canlıya ek olarak kuş ve balıkları da enfekte edebilirler [Chen vd., 2020]. Enfekte edebildiği canlı çeşitliliğinin çok olması nedeniyle bu canlıların insanlara virüsün bulaşmasında aracı olabileceği tahmin edilmektedir. Yarasalarda yaklaşık olarak 5000 tür koronavirüs tespit edilmiştir [Chen vd., 2020]. SARS, MERS ve COVID-19 dahil toplamda 6 farklı koronavirüs kaynaklı hastalığın taşıyıcı canlılar yoluyla insanlarda orta, ciddi ve hatta ölümcül bozukluklara neden olduğu raporlanmıştır [Chen vd., 2020], [Su vd., 2016], [Ruiz-Aravena vd., 2022].

Koronavirüsler pozitif yönlü RNA virüsleridir [Liu vd., 2020]. Ortalama bir RNA virüsü genomuna göre daha uzun (yaklaşık 30 kbp) genoma sahiptir (Şekil 4.1) [Sajid vd., 2022]. Spike, membran, zarf ve nükleokapsit olmak üzere 4 yapısal protein ifade ederler. Bunlara ek olarak 9 aksesuar ve 16 yapısal olmayan protein kodlayabilirler (Şekil 4.1) [Chen vd., 2020], [Sajid vd., 2022]. SARS-CoV-2 virüsü insan hücrelerine anjiotensin çevirici enzim 2 (ACE2) aracılığıyla alınır. Virüsün spike proteini ACE2’ye bağlanarak virüsün insan konak hücresine girişini başlatır. Spike proteini trimerik bir yapı oluşturarak viral membranda açıklık oluşturur. Ardından 2 alt birimi olan spike proteinin ilk alt birimi ACE2’nin reseptör bağlanma bölgesine (RBD) bağlanırken ikinci alt birimi insan ve virüs membranlarının füzyonunu başlatır

(Şekil 4.2) [Pastorek vd., 2022]. Bu füzyonu transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) aracılığıyla tetikler [Zhou vd., 2022], [Pinto vd., 2020], [Walls vd., 2020]. Spike proteini COVID-19 tedavisi için dizayn edilen nötralize edici antikorların ve bazı aşı çalışmalarının hedef proteinlerinden en önemlisidir [Liu vd., 2020].

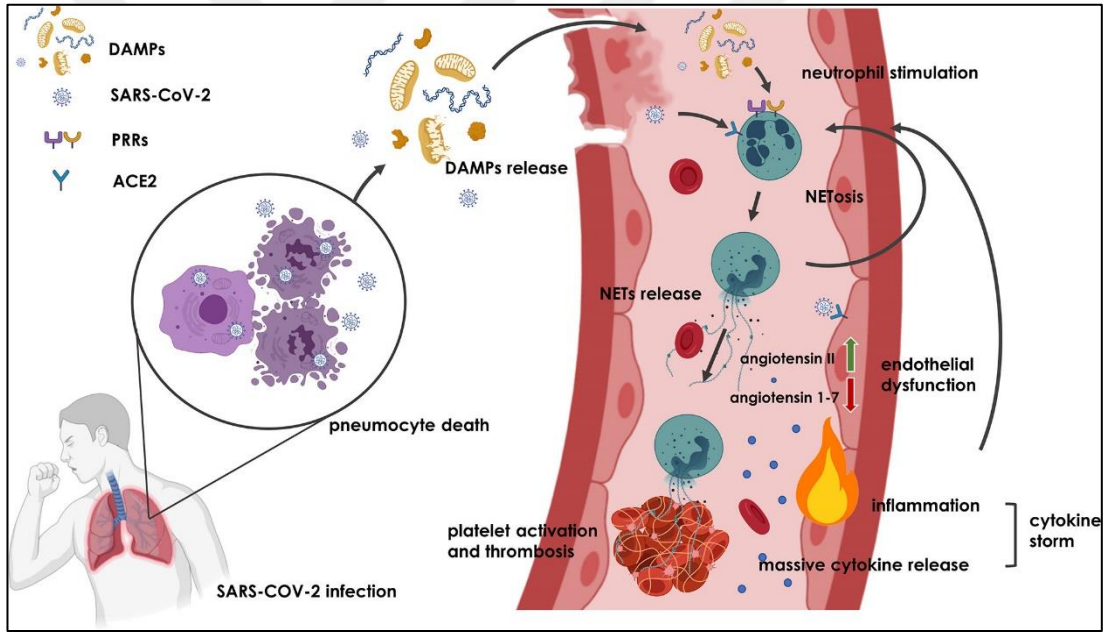


Şekil 4.1: SARS-CoV-2 genomu, yapısı ve fonksiyonel bölgelerinin temsili gösterimi [Sajid vd., 2022].

4.1. Koronavirüs Hastalığı İlişkili NETosis

COVID-19 hastalarının plazmasında serbest DNA, DNA-MPO kompleksi ve Cit-H3 miktarının artışı gibi NETosis ile ilişkilendirilebilecek belirteçlerin yüksek olduğu ve

bunun hastalığın kötü seyri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [Zuo vd., 2020], [Veras vd., 2020]. COVID-19'a sebep olan SARS-CoV-2 virüsü solunum sistemindeki epitel hücreleri enfekte etmesinin ardından bu hücrelerden sitokin ve kemokin salgılanmasını ve nötrofillerin bu bölgeye kemotaksisini tetikler (Şekil 4.2) [Rong vd., 2024], [Pastorek vd., 2022]. Göç eden ve aktive olan nötrofiller oksidatif patlama yoluyla ROS üreterek ya da NE ve PAD4 gibi enzimleri aktive ederek NET oluşumunu tetiklerler. COVID-19'da üretilen bu NET yapılarının akciğer, karaciğer ve kalp hücrelerinde immün tromboza ve yine karaciğer ve böbrekte damar tıkanıklığına neden olduğu gösterilmiştir [Rong vd., 2024]. Bu durum NET yapılarının immün sistem için önemli olmasına rağmen aşırı ve kontrolsüz NET oluşumunun COVID-19'da olumsuz etkilere neden olabileceğini göstermiştir (Şekil 4.2) [Rong vd., 2024], [Pastorek vd., 2022].



Şekil 4.2: SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu NET oluşumu ve inflamasyonun şematik gösterimi [Pastorek vd., 2022].

NET oluşumu, epitel hücrelerin salgıları aracılığıyla olmadan, direkt olarak SARS-CoV-2 ile enfekte nötrofillerde de meydana gelebilir [Veras vd., 2020]. Yapılan çalışmalarda hem canlı SARS-CoV-2'nin hem de SARS-CoV-2 replikasyonunun nötrofillerde NET oluşumunu tetiklediği bulunmuştur. Aynı çalışmada SARS-CoV-2'nin nötrofil hücrelerini ACE2 ve TMPRSS2 aracılığıyla enfekte ettikten sonra doğrudan, PAD4 aracılı olarak NETosis'i uyardığı belirtilmiştir [Veras vd., 2020].

Ayrıca bazı durumlarda nötrofillerin SARS-CoV-2 tarafından C-tipi lektin reseptörlerinin uyarılmasıyla doğrudan NET oluşturduğu da bilinmektedir [Lemmp vd., 2021]. Buna ek olarak MPO'nun C3 aracılığıyla kompleman sistemi devreye sokması da NETosis'i artırır [de Bont vd., 2019].

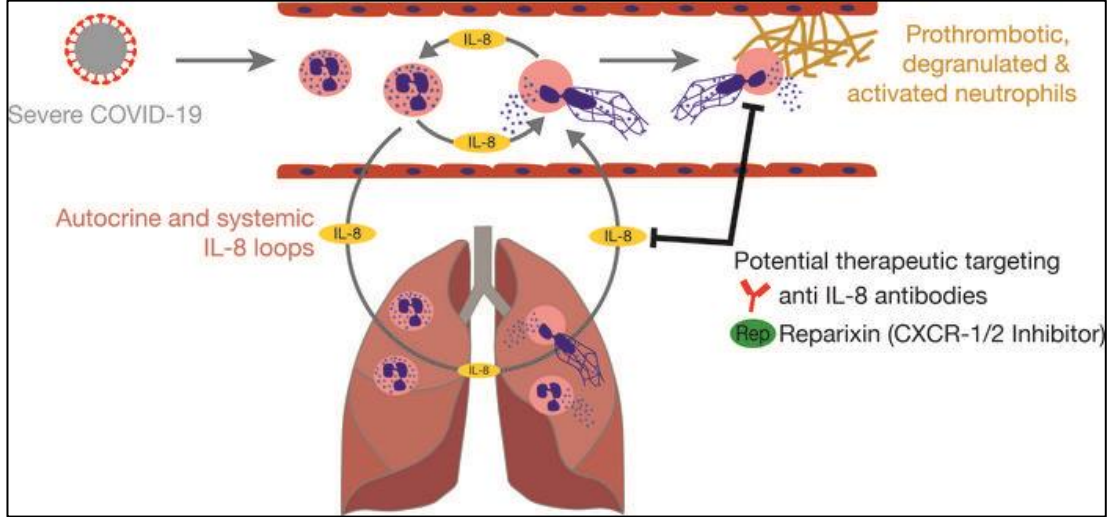
COVID-19 hastalarında düşük dansiteli nötrofil (LDN) miktarının arttığı ve bu artışın NET miktarını artırarak tromboza ve organ yetmezliklerine neden olduğu raporlanmıştır. SARS-CoV-2 enfeksiyonu monosit ve makrofajları aktive ederek IL-1 β ve IL-8 salgılanmasını artırır ve nötrofillerin kan ve dokularda daha fazla NET oluşturmaya sebep olur. Fazla NET üretimi de yine makrofajlardan IL-1 β salgılanmasını tetikleyerek COVID-19 hastalarının immün sisteminin hızla bozulmasında rol oynar [Park vd., 2020], [Rong vd., 2024]. NET oluşumu ayrıca pıhtılaşma faktörlerinin aktive olmasına da neden olur. NET yapıları hem histonlar aracılığı ile trombin üretimini artırarak hem de bölgeye gelen pıhtılaşma önleyici moleküllerin MPO ve NE enzimleri ile yıkılması sonucu pıhtılaşmayı artırarak doku hasarına neden olur [Rong vd., 2024].

4.2. Nötrofiller ve NETosis Hedefli COVID-19 Terapileri

COVID-19 ile nötrofiller arasındaki ilişkiye dair yeni bilgiler ortaya çıktıkça bilim insanları da hastalığın tedavisi için nötrofiller ve genellikle NETosis'in olumsuz etkilerini inhibe etmeye yönelik yeni ilaç/tedavi stratejisi geliştirme çabasına girmiştir. COVID-19 tedavisi için bilinen NETosis inhibitörlerinin yanı sıra birçok ilaç da halen geliştirilme aşamasındadır. Bu ilaçlar genellikle NET oluşumunda görev alan MPO, NE, PAD4 ve gasdermin D gibi enzimlerin inhibisyonuna yöneliktir [Rong vd., 2024]. Bu ilaçlar arasında Lonodelestat, alvestat ve CHF6333 gibi faz 1 çalışmaları süren hem NE'nin toksik etkisini hem de NET oluşumunu baskılayan NE inhibitörleri; Cl-amidine ve GSK484 gibi NET oluşumunu ve trombozu azaltan PAD4 inhibitörleri ve disülfiram gibi daha önce alkolizm tedavisinde kullanılan ve NET oluşumunu sınırlandıran gasdermin D inhibitörleri sayılabilir [Rong vd., 2024].

NET yapılarının DNaz ya da ribonükleaz gibi enzimlerle yıkımı COVID-19 hastalarına bu enzimlerin solunum yoluyla verilmesiyle denendiğinde NET'lerin neden olduğu trombozun azaldığı görülmüştür. Aynı doğrultuda yapılan uzun süreli etki vermesi planlanan DNaz-1 nano parçacıkları COVID-19 modeli farelere

verildiğinde NET yapılarının neden olduğu sepsisin azaldığı raporlanmıştır [Park vd., 2021]. COVID-19 hastalarında artan NETosis ile oluşan tromboz, organ hasarı ve yetmezliği, akut solunum bozukluğu sendromu gibi etkilerin SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu sitokin fırtınasının inhibisyonu ile çözülebileceği düşünülmüştür. Bunun için Colchicine gibi nötrofillerin yeniden düzenlenerek inflamasyon bölgesine kemotaksisini bloklayan ilaçlar denenmektedir [Rong vd., 2024]. Buna ek olarak NET oluşumunu tetikleyen CXCL8, IL-6, IL-1 β kemokin ve sitokinlerin inhibitörleri ve nötralize edici antikorumları ya da bu sitokin ve kemokinlerin nötrofillerdeki reseptörlerini bloklayan CXCR1/2 inhibitörü reparixin gibi ilaçlar sitokin fırtınasının neden olduğu etkileri bastırmak için denenmektedir (Şekil 4.3) [Morgulchik vd., 2021], [Landoni vd., 2022], [Kaiser vd., 2021]. Geliştirilen tüm bu ilaç ve antikorumlara rağmen COVID-19 hastalığının neden olduğu etkiler halen tam anlamıyla ortadan kaldırılamamıştır. Hem COVID-19 hem de gelecekte meydana gelebilecek NETosis bağlantılı pandemik salgınlara çözüm olarak en az yan etkiye sebep olan yeni ve etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve yeni ilaçların keşfedilmesi kaçınılmazdır [Rong vd., 2024].



Şekil 4.3: COVID-19 hastalarında görülen IL-8 bağlantılı NET oluşumunun anti-IL-8 antikorumları ya da CXCR1/2 inhibitörü Reparixin ile inhibisyonu [Kaiser vd., 2021].

5. MATERYAL

Tablo 5.1: Antikorlar

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Mouse anti-human DEK	610948	BD Biosciences
Rabbit anti-human DEK	A301-335A	Bethyl Laboratories
Mouse anti-human IL-8/CXCL8	MAB208	R&D
Mouse IgG1 isotype control	MAB002	R&D
Mouse anti-human NE	MA1 40220	Thermo
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 647	4414S	Cell Signalling Technologies
Goat anti-mouse Alexa Fluor 555	4409S	Cell Signalling Technologies

Tablo 5.2: Rekombinant Proteinler

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Rekombinant Human DEK	MBS968198	Mybiosource
Rekombinant Human IL-8	208 IL-010CF	R&D

Tablo 5.3: İnhibitörler

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Reparixin	HY-15251	MedChem

Tablo 5.4: Boyalar

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Sytox Green	S7020	Thermo
Vectashield mounting media with DAPI	H-1200	Vector Lab

Tablo 5.5: Kitler

Ürün	Katalog Numarası	Firma
COVID-19 IgG/IgM Rapid Test	Uncov-40	Unscience
Human Protein DEK ELISA kit	CSB-EL006710HU	Cusabio
Human Interleukin 6 ELISA kit	CSB-E04638h	Cusabio
Human IL-8 ELISA Kit	ab214030	Abcam
Human IL-1 beta ELISA Kit	ab214025	Abcam
Human Myeloperoxidase ELISA Kit	ab272101	Abcam
Citrullinated Histone H3 (Clone 11D3) ELISA Kit	501620	Cayman
TMB substrate kit, Pierce™	34021	Thermo

Tablo 5.6: Kimyasal ve Solüsyonlar

Ürün	Katalog Numarası	Firma
RPMI 1640	52400025	Gibco
1X PBS	15140122	Gibco
BSA	A2153-10G	Sigma-Aldrich
EDTA	AM9261	Invitrogen
Trypan Blue	T10282	Invitrogen
Ethanol	9200525000	Isolab
Paraformaldehyde	P6148	Sigma Aldrich
Triton 100-X	T8787-100ML	Sigma Aldrich
Histopaque 1119	11191	Sigma Aldrich
1X ACK Lysis Buffer	RGF-315	KD Medical
Percoll	P1644	Sigma Aldrich
Percoll	SC500790A	Santa Cruz
Micrococcal Nuclease	EN0181	Thermo
Poly-L-Lysin	P5899	Sigma Aldrich
PMA	P1585	Sigma Aldrich

Tablo 5.7: Sarf, plastik ve cam malzemeler

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Serum Toplama Tüpü	367955	BD
EDTA'lı Kan Toplama Tüpü	367525	BD
8 kuyulu plaka	80827	Ibidi
96 kuyulu plaka	92096	TPP
Petri (100×20 mm)	93100	TPP
Thoma Lamı	I.075.03.002	Isolab
Lam SuperFrost® Menzel	10118091	Thermo Scientific
Lamel (22x22m)	075.00.003	Isolab
Countes Slides	NE-EVS-50	Nanoentek
Kriyoboks	616001	NEST
Kriyotüp	607101	NEST
Falkon 15ml / 50ml	510015 / 510050	Capp
Şırınga ucu filtre (0.45 µm)	99745	TPP
Şırınga ucu filtre (0.22 µm)	99722	TPP
Ependorf Tüp 0,6 ml /1,5 ml	MCT-060-C/150-C	Axygen
Ependorf Tüp (PCR 0,2 ml)	PCR-02-C	Axygen
Pipet ucu (1000 µl)	5130150	Capp
Pipet ucu (200 µl)	5030090	Capp
Pipet ucu (20 µl)	315016	NEST
Pipet ucu (10 µl)	314016	NEST
Serolojik Pipet	SP-05/10/25/50-C	Capp
Parafilm	058.01.001	Isolab

Tablo 5.8: Cihazlar

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Konfokal Mikroskop	LSM 880	Zeiss
ZOE Floresan Hücre Görüntüleyici	1450031	Biorad
Çalkalayıcı	S2025-B-230V	Labnet International
Çalkalayıcı	RS-60	Biosan
Heat blok	BSH1002-E	Benchmark
Multi rötor	Multi RS-60	Biosan
Etüv	466-3510	VWR
Mikro pipet	F167300	Gilson
Pipetör	PA-100	Capp
Vorteks	62203001	Isolab
Mikro Santrifüj	1-14	Sigma
Hassas terazi	I.602.32.001	Isolab

6. YÖNTEM

6.1. COVID-19 Hastalığı Açısında Sağlıklı, Akut ve Konvelesan Bireylerden Serum Materyalinin Eldesi

Deneyleerde kullanılacak sağlıklı ve COVID-19 hastası bireylerden serum toplandı (n=60). Sağlıklı serum örnekleri yaşı 18 ve üzerinde olan kadın ve erkek, son 14 gün içerisinde COVID-19 belirtisi göstermediğini ve bilinen herhangi bir kronik enflamatuvar hastalığı olmadığını bildiren gönüllü bireylerden alındı. Toplanan sağlıklı birey serumlarının SARS-CoV-2 negatifliği daha sonra antikor testi ile doğrulandı. Bu tezde kullanılan gönüllü sağlıklı birey serumlarından 30 tanesi Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı üyesi Doç. Dr. Naci Çine ve ekibi tarafından sağlandı. Bunlara ek olarak yukarıdaki şartları sağlayan 30 farklı gönüllü bireyden kan alınarak serum izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için her bireyden BD Vacutainer® serum tüplerine yaklaşık olarak 5 ml kan alındı. Alınan kanlar 2 saat boyunca oda sıcaklığında dik bir şekilde inkübe edildi. Ardından 1000 rpm hızında 15 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüjlendi ve üst katmanda toplanan serum örneği toplandı. Kriyotüpler içerisine alıktlandı. Alıktlanan örnekler -20°C’de uzun süreli olarak saklandı.

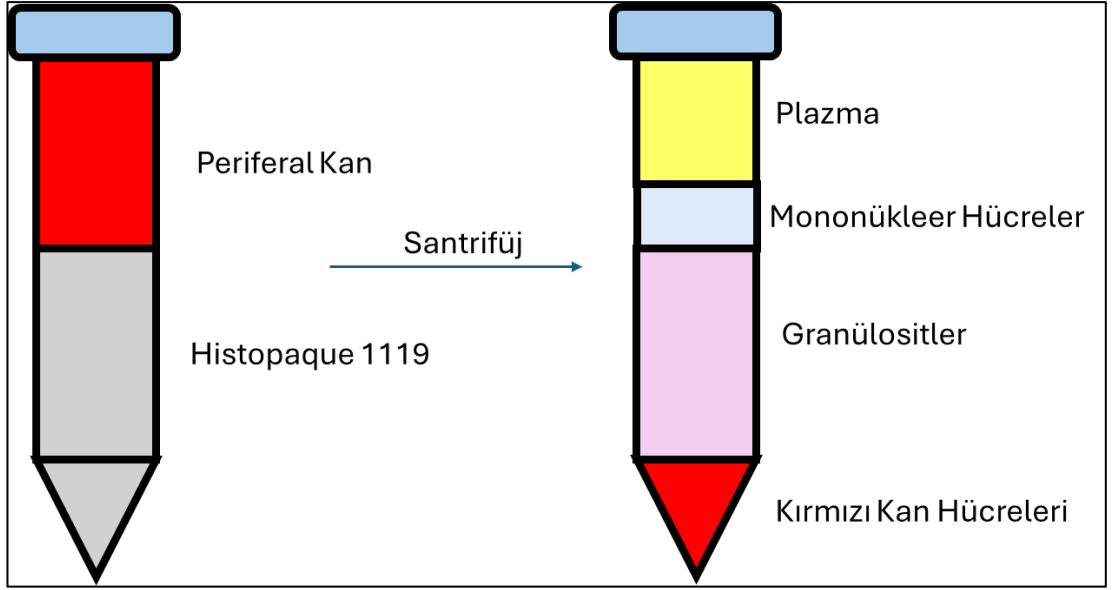
Hasta serumu örnekleri ise yaşı 18 ve üzerinde olan kadın ve erkek, SARS-CoV-2 pozitif olduğu tespit edilmiş, COVID-19 hastalığını aktif olarak geçirmiş olan, yatarak tedavi görmüş ya da görmemiş 68 bireyden serum örneği alındı. Serum örnekleri hastandan alındıkları döneme göre akut (n=23) ve konvelesan (n=45) olarak 2 gruba ayrıldı. SARS-CoV-2 virüsü enfeksiyonun 1-7 günlerinde alınan serum örnekleri akut, 21-28 günlerinde alınan serum örnekleri konvelesan olarak kabul edildi. Alınan bu serum örnekleri klinik araştırma ve tedavi amaçlı kullanımdan artmış olan serum örnekleridir. Bu tezde kullanılan tüm hasta serumları (n=68) Marmara Üniversitesi, Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı üyesi Prof. Dr. Ayşegül Karahasan ve ekibi tarafından sağlandı.

6.2. SARS- CoV-2 Antikor Testi

Bu tezde kullanılan tüm sağlıklı serum örnekleri ve sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri COVID-19 negatifliğini değerlendirmek amacıyla ticari olarak satın alınan IgG/IgM COVID-19 hızlı yatay akış antikor testi ile test edildi. Testten önce değerlendirilecek örnek ve kit oda sıcaklığına getirildi. Ardından 20 µl sağlıklı serum örneği ya da 30 µl sağlıklı bireyden nötrofil izolasyonu sırasında alınmış plazma örneği testin üzerindeki ilgili kuyucuğa eklendi. Örneğin üzerine 1 damla kit tarafından sağlanan yürütme solüsyonu damlatıldı. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra, testin belirteç bölgesinden yüksek çözünürlüklü görüntüler alındı. Analiz ve değerlendirme için görüntüler JPEG olarak kaydedildi. Örneklerin SARS-CoV-2 pozitif ve negatifliği IgG, IgM ve kontrol bant tespitlerine göre kit talimatları ile görsel inceleme yoluyla değerlendirildi (**EK-A**).

6.3. Nötrofil İzolasyonu

Deneysel olarak kullanılmak üzere 18 yaş ve üzeri olan kadın ve erkek, son 14 gün içerisinde COVID-19 belirtisi göstermemiş ve bilinen herhangi bir kronik enflamatuar hastalığı olmayan gönüllü bireylerden alınan periferik kandan nötrofil izolasyonu yapıldı. Bunun için gönüllü bireylerden 6ml kan BD Vacutainer® K₂EDTA tüplerine alındı. 6ml histopaque 1119, 15 ml falkon tüp içerisine koyuldu. Alınan kandan 6 ml bekletilmeden histopaque 1119 üzerine karıştırılmadan yavaşça eklendi. Falkon 800 g hızında 20 dakika boyunca hızlandırma değeri 1 (acceleration) ve frenleme değeri ise 0 (brake) olacak şekilde santrifüj edildi. Kan ve histopaque 1119'un gradiyent oluşturduğu görüldükten sonra en üstte bulunan plazma kısmı ve plazmanın hemen altında bulunan beyaz – şeffaf fazda kalan periferik kan mononükleer hücreleri atıldı (**Şekil 6.1**). Plazma örneği atılmadan önce SARS-CoV-2 antikor testi yapıldı. Ardından kırmızı-pembe renkteki granülosit, kırmızı kan hücresi ve histopaque 1119 karışımı 50 ml falkon tüpte toplandı ve 50 ml'e kadar 1X DPBS (Ca⁺² ve Mg⁺² iyonlarını içermeyen) ile tamamlandı. Gradyentteki fazlar alınırken birbirlerine karışmamalarına dikkat edildi. Falkon 1200 rpm hızında 5 dakika boyunca hızlandırma değeri 5 (acceleration) ve frenleme değeri ise 4 (brake) olacak şekilde santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra yıkanan granülosit ve eritrosit karışımı hücrelerden nötrofil izolasyonuna iki farklı yöntemle devam edildi.



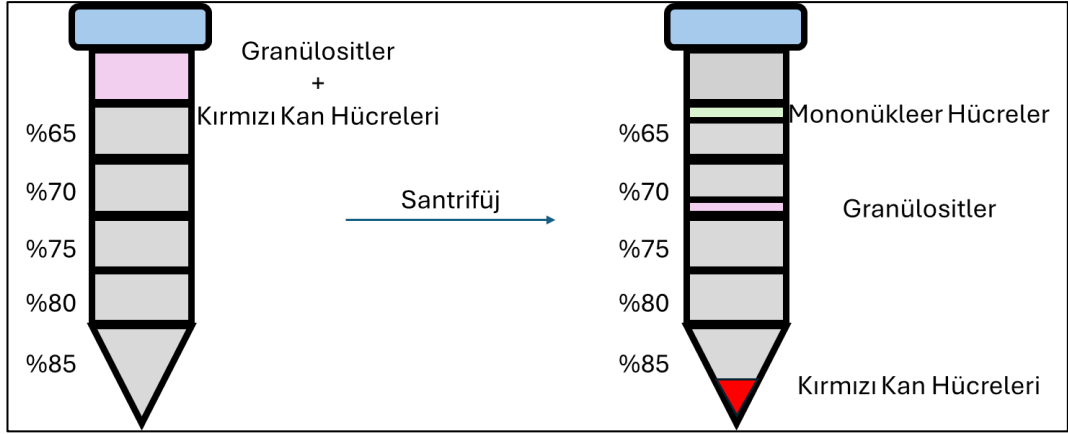
Şekil 6.1: Periferel kan örneğinin yoğunluk gradyanlı santrifüjlenmesi

6.3.1. ACK Lizis Solüsyonu İle

1X DPBS ile yıkanan granülosit ve eritrosit karışımı hücreler santrifüjden alındıktan sonra süpernatant dikkatlice atıldı. Pelet hafifçe karıştırıldıktan sonra 10ml 1X ACK Lizis solüsyonu eklendi. Hücreler 5 dakika boyunca, oda sıcaklığında, hafifçe karıştırılarak inkübe edildi, eritrositlerin ortamdan uzaklaşması sağlandı. İnkübasyon sonunda 40 ml 1X DPBS eklendi. Falcon 1200 rpm hızında 5 dakika boyunca hızlandırma değeri 5 (acceleration) ve frenleme değeri ise 4 (brake) olacak şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler tekrar 10ml 1X ACK Lizis solüsyonu ile 5 dakika boyunca, hafif şekilde çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda falkon 1X DPBS ile dolduruldu ve santrifüj edildi (1200 rpm, 5 dakika, hızlandırma 5, frenleme 4). Süpernatant atıldı ve hücreler 20 ml 1X DPBS ile son kez yıkandı ve santrifüj edildi (1200 rpm, 5 dakika, hızlandırma 5, frenleme 4). Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Elde edilen nötrofiller %1 sağlıklı bireyden alınmış serum içeren 1 ml RPMI besiyeri içerisinde çözüldü. Ardından hücreler sayım için hazırlandı.

6.3.2. Percoll Gradyent Yöntemi İle

1X DPBS ile yıkanan histopaque 1119 gradiyentinden alınan granülosit ve eritrosit hücrelerinin olduğu faz santrifüjden alındıktan sonra 2 ml 1X DPBS içerisinde çözüldü. Ardından granülositleri eritrositlerden ayırmak için kullanılacak percoll gradienti hazırlandı. Bu gradiyenti hazırlamak için 9 ml percoll ile 1ml 10X PBS karıştırılarak %100'lük percoll elde edildi. Daha sonra hazırlanan %100 percoll ve 1X DPBS kullanılarak %85, %80, %75, %70 ve %65 dilüsyonları hazırlandı. 15 ml falkona en altta %85 percoll dilüsyonu olacak şekilde aşağıdan yukarıya doğru %85-80-75-70-65 dilüsyonlarının her birinden 2 ml hacimde birbirlerine karıştırılmamasına özen gösterilerek eklendi. Hazırlanan gradiyentin üzerine 2 ml granülosit ve eritrosit hücre karışımı eklendi. Falkon 800 g hızında 20 dakika boyunca hızlandırma değeri 1 (acceleration) ve frenleme değeri ise 0 (brake) olacak şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst fazda yoğunlaşan monosit hücre fazı (%65 percoll dilüsyonuna denk gelen faz) tamamen atıldı. Ardından %70-80 percoll dilüsyonu aralığında bulutsu bir faz oluşturan nötrofil topluluğunun tamamı toplandı ve yeni bir 50 ml falkona aktarıldı (**Şekil 6.2**). Monosit ve nötrofil katmanları ayrıştırılırken hücre tipleri arasında çapraz kontaminasyon olmaması amacıyla her adımda pipet ucu değiştirildi. Nötrofillerden percoll uzaklaştırması için falkon tüpü 50 ml'ye kadar steril 1X DPBS ile dolduruldu ve hücreler 1200 rpm hızında 5 dakika boyunca hızlandırma değeri 5 (acceleration) ve frenleme değeri ise 4 (brake) olacak şekilde santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Elde edilen nötrofiller %1 sağlıklı bireyden alınmış serum içeren 1ml RPMI besiyeri içerisinde çözüldü. Ardından hücreler sayım için hazırlandı.



Şekil 6.2: Percoll ile gradyan santrifüj sonrası granülositlerin konumu

6.4. Poly-L-Lysin Kaplama

Deneyleerde kullanılacak hücre kültürü tabakları nötrofil tutunmasını kolaylaştırmak amacıyla deneyin bir gün öncesinde Poly-L-Lysin ile kaplandı. Bunun için 1 mg/ml konsantrasyondaki poly-l-lysin steril su kullanılarak 1:10 dilüsyonla 100 µg/ml olan çalışma solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu çalışma dilüsyonundan 96 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarının her bir kuyusu için 50 µl eklendi. Ardından kuyular oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda kuyular poly-l-lysin toplandı ve 200 µl 1X DPBS ile 2 kez yıkandı. Kuyuların steril bir şekilde kuruması için hücre kültürü tabakları UV ışığı altında en az 2 saat boyunca kurumaya bırakıldı.

6.5. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları Oluşumunun Uyarılması ve Baskılanması

Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde çözüldükten sonra poly-l-lysin ile kaplanmış 96 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına her kuyuda 10^5 nötrofil olacak şekilde, 60µl aynı besiyeri içerisinde ekildi. Ardından hücrelerin tutunması için 20 dakika boyunca 37°C ve %5 CO₂ şartlarında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilgili kuyulara 20 µl %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde hazırlanmış nötrofil hücre dışı tuzaklarının oluşumunu inhibe etme potansiyeli taşıyan ve final konsantrasyonu 2,5 µg/ml anti DEK (BD), 2,5 µg/ml anti DEK (Bethyl), 2,5 µg/ml anti IL8 ya da 3,2–20 µM Reparixin olacak şekilde eklendi. Ardından rDEK ve rIL8 ile NETosis uyarılacak hücreler için 1 saat, hasta serumu kullanılarak NETosis

uyarılacak hücreler için 2 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ şartlarında inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübe edilen hücrelerin üzerine 20 µl %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde hazırlanmış nötrofil hücre dışı tuzaklarının oluşumunu uyarması beklenen ve final konsantrasyonu 3,5 µg/ml rDEK, 100 ng/ml rIL8 olacak şekilde rekombinant proteinler ya da 20 µl hasta serumu (1:5) eklendi. Rekombinant protein eklenerek NETosis uyarılacak hücreler 1 saat, hasta serumu kullanılarak NETosis uyarılacak hücreler ise 2 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ şartlarında inkübe edildi. Nötrofil hücre dışı tuzaklarının oluşumu inkübasyon süresinin ardından Sytox green boyaması ya da NET ile ilişkili MPO kantifikasyonu yoluyla değerlendirildi.

6.6. Sytox Green Boyaması Yoluyla NETosis Değerlendirilmesi

Nötrofiller 1 ya da 2 saat boyunca NETosis için uyarıldıktan sonra kuyular 20 µl %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde hazırlanmış finalde 500nM Sytox green olacak şekilde eklendi. Ardından Sytox green boyasının hücre dışı DNA'yı boyaması için 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerine 120 µl %8 PFA solüsyonu eklendi. Böylece hücreler finalde %4 PFA içerisinde gece boyu oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyondan sonra PFA ortamdan uzaklaştırıldı ve 200 µl 1X DPBS yavaşça eklendi. Ardından hücreler ZOE floresan hücre görüntüleyicide 20X objektifte incelendi. Her kuyudan 5 farklı bölgenin basit ışık (brightfield) ve yeşil floresan kanallarında görüntüler alındı. Alınan görüntüler birleştirildi (merge) ve DANA I ile analiz edildi.

6.7. NET İle İlişkili MPO Kantifikasyonu ile NETosis Değerlendirilmesi

Nötrofillerin hücre dışı tuzak oluşumu için inkübasyonu bittikten sonra besiyeri yavaşça atıldı. Hücrelerin üzerine 100 µl 1X DPBS içerisinde 5U/ml konsantrasyonda Micrococcal Nuclease eklendi. Ardından hücre dışı DNA'nın kesilmesi için 10 dakika boyunca 37°C ve %5 CO₂ şartlarında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için 2 µl 0,5 mM EDTA eklendi (final konsantrasyonu 10mM EDTA). Ardında kuyulardaki 1X DPBS V şekilli tabanlı 96 kuyulu hücre kültürü tabaklarına aktarılır ve 400 g hızında 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatant tekrar düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültürü tabağına

aktarıldı. TMB substratı eşit hacimde TMB ve H₂O₂ karıştırılarak hazırlandı. Aktarılan süpernatantın üzerine eşit hacimde TMB substratı eklendi (ortalama 90-95 µl). Ardından oda sıcaklığında kuyuların rengi maviye döndüğü görülene kadar 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyon eklenen TMB miktarı kadar 2N sülfirik asit ile durduruldu. Kuyuların 450nm’deki absorbans değerleri MultiSkan FC plate okuyucu kullanılarak alındı.

6.8. DANA I Analizi

NETosis uyarılan ve görüntüleri alınan nötrofiller ImageJ ve Java temelli bir program olan DNA Alanı ve NETosis Analizi (DANA) kullanılarak nötrofil hücre tuzaklarının oluşumu değerlendirildi [Rebernick vd., 2018]. Bunun için öncelikle basit ışık mikroskopuyla alınan görüntülerde toplamda kaç hücre olduğu ImageJ programı kullanarak belirlendi. Ardından ImageJ programına kurulan DANA I eklentisi ile Sytox green pozitif hücre sayısı bulundu. DANA I eklentisi çalıştırıldığında her fotoğraf için o fotoğraftaki hücre sayısını ve özelliklerini (en, boy, floresan yoğunluk, yuvarlaklık, en fazla ve en az parlaklık vb.) gösteren .csv uzantılı bir çıktı alındı. Gruplardaki .csv uzantılı dosyalar her bir grup için ayrı ayrı Java temelli DANA II programına yüklendi. Burada en küçük çaplı 5 NET oluşturmamış hücre, sağlıklı hücre kabul edildi ve bu sağlıklı hücrelerin ortalama alanından 2 kat daha büyük alana sahip hücreler ise NET oluşturduğu kabul edilecek şekilde ayarlandı. DANA II programından belirtilen ayarlarla çalıştırdıktan sonra çıktı olarak özet bilgiler içeren .csv uzantılı çıktı alındı. Bu çıktıdan analiz edilen fotoğraflardan Sytox pozitif hücrelerin yüzden kaçının NETosis’e gittiğinin ve DNA alanının ortalaması alındı. Toplanan tüm bu veriler ile her grubun NETosis’e gitme oranını bulmak için önce NETosis yüzdesi ve toplam Sytox pozitif hücre sayısı oranlanarak, Sytox pozitif hücrelerin kaç tanesinin NETosis’e gittiği bulundu. Ardından bu sayı ile toplam hücre sayısı oranlanarak, fotoğraflardaki hücrelerin yüzde kaçının NETosis’e gittiği ortaya çıkarıldı [Rebernick vd., 2018].

6.9. İmmüno Floresan Boyama

Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde çözüldükten sonra poly-l-lysin ile kaplanmış 8 kuyucuklu IBIDI cam hücre kültürü

tabaklarına her kuyuda 2×10^5 nötrofil olacak şekilde, 100µl aynı besiyeri içerisinde ekildi. Ardından hücrelerin tutunması için 20 dakika boyunca 37°C ve %5 CO_2 şartlarında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilgili kuyulara 50 µl %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde hazırlanmış nötrofil hücre dışı tuzaklarının oluşumunu inhibe etme potansiyeli taşıyan ve final konsantrasyonu 5 µg/ml anti DEK (Bethyl) ya da 400 nM reparixin olacak şekilde eklendi. Ardından hücreler 2 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 şartlarında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerine 50 µl %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde hazırlanmış nötrofil hücre dışı tuzaklarının oluşumunu uyarması beklenen ve final konsantrasyonu 3,5 µg/ml rDEK 100 ng/ml rIL8 olacak şekilde rekombinant proteinler ya da 50 µl hasta serumu (1:5) eklendi. Hücreler 2 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 şartlarında inkübe edildi. Sonra kuyulara 50 µl %1 sağlıklı serum içeren RPMI içerisinde hazırlanmış finalde 500 nM Sytox green olacak şekilde eklendi. Ardından Sytox green boyasının hücre dışı DNA'yı boyaması için 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

IBIDI-8 kuyulu hücre tabağında yapılan NETosis deneyindeki bu hücreler immünofloresan boyamada kullanıldı. Hücrelerden Sytox uzaklaştırılmadan 250 µl olan total besiyeri hacmine, 250 µl %8'lik PFA eklendi (final konsantrasyonu %4 PFA) ve hücreler 2 saat oda sıcaklığında fikse edildi İki saat sonunda PFA hücrelerden uzaklaştırıldı, bir kez 700 µl 1X DPBS'le yıkandı ve hücreler 400 µl 1X DPBS içerisinde gece boyu $+4^\circ\text{C}$ de bekletildi. Ertesi gün kuyulardan 1X DPBS uzaklaştırıldı. 200 µl %0,5 Triton-X-100 eklendi (1X DPBS içinde hazırlandı). 1 dakika oda ısısında inkübe edildi ve Triton-X-100 uzaklaştırıldı. 400 µl 1X DPBS eklenerek, 3 kez, 1er dakikalık yıkamalar yapıldı. Hücrelerin üzerine 200 µl %2 BSA içeren 1X DPBS eklenerek bloklandı. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. BSA içeren DPBS atıldı ve hücrelerin üzerine 200 µl primer DEK antikor eklendi (Purifiye edilmiş tavşan anti insan DEK: Bethyl). DEK antikoru %1 BSA'lı PBS içerisinde 1:50 oranında seyreltilerek hazırlandı. Hücreler DEK antikoru ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. 1X DPBS ile, 3 kez, beşer dakikalık yıkamalar yapıldı. Yıkamalar sonunda 1X DPBS atıldı ve hücrelerin üzerine 200 µl sekonder antikor eklendi. (Alexa Fluor 647 Rabbit). Alexa fluor 647 antikoru %1 BSA içeren 1X DPBS kullanılarak 1:500 seyreltildi. Hücreler 1 saat boyunca oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübe edildi. Ardından 1X DPBS ile, 3 kez, beşer dakika boyunca yıkandı. Hücrelerden 1X DPBS uzaklaştırıldı. Hücreler 200 µl %4 PFA ile 20 dakika boyunca tekrar fikse

edildi. Fiksasyon sonunda hücreler 3 kez 1X DPBS ile yıkandı ve 200 µl %2 BSA içeren 1X DPBS ile 30 dakika boyunca yeniden bloklandı. BSA içeren 1X DPBS atıldı ve hücrelerin üzerine 200 µl primer Nötrofil elastaz antikor (Fare, anti insan) eklendi. Nötrofil elastaz antikor %1BSA'lı 1X DPBS içerisinde 1:50 oranında seyreltilerek hazırlandı ve gece boyu antikor ile +4°C' de bekletildi. Ertesi gün antikor uzaklaştırıldı ve 3 kez 1X DPBS ile yıkandı. 1X DPBS uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 200 µl sekonder antikor eklendi (Alexa Fluor 555 Fare). Alexa fluor 555 antikor %1 BSA'lı 1X DPBS içerisinde 1:500 sulandırılarak hazırlandı Oda sıcaklığında 60 dakika boyunca sekonder antikor ile inkübasyon gerçekleştirildi. Hücreler 3 kez 1X DPBS ile yıkandıktan sonra Zeiss LSM880 Konfokal Mikroskobu 200X ve 630X büyütmede görüntüler alındı.

6.10. DEK, IL-8, IL-6, IL-1 β , Cit-H3 ve MPO Belirteçlerinin ELISA ile Değerlendirilmesi

Sağlıklı ve hasta bireylerden alınan serumlardaki DEK proteininin; interlökin 8 interlökin 6, interlökin 1 beta sitokinlerinin ve sitrülünlenmiş histon 3 ile miyeloperoksidaz gibi NETosis belirteçlerinin miktarı ELISA yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla serumlar DEK proteini için 1:5, IL8 sitokini için 1:8, IL6 sitokini için 1:5, IL1 β sitokoni için 1:5, Cit-H3 proteini için 1:5, MPO proteini için 1:8 sulandırılarak ticari olarak satın alınmış ELISA kitleri kullanılarak üreticinin belirlediği protokollere göre deneyler gerçekleştirildi. Sonuçlar MultiSkan Fc plaka okuyucu ile ölçüldü.

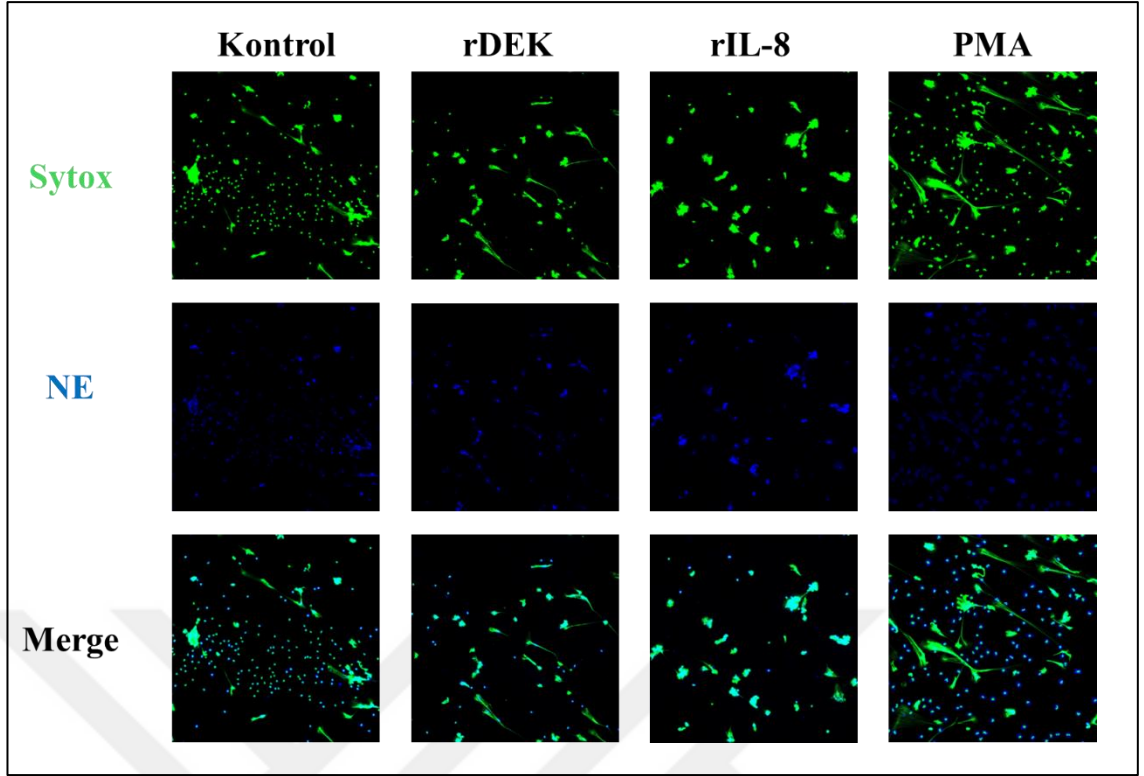
6.11. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasındaki bağımsız deneyler sonucunda bulunan sonuçlar, kurulan deney planına uygun amaçla Mann-Whitney U testi, unpaired student-t testleri ve Pearson korelasyonları ile değerlendirildi. Ortalamaya standart sapmanın 2 katından daha uzak olan uç değerler analiz dışı bırakıldı. Gerçekleştirilen tüm deneysel süreç sonunda elde edilen veriler GraphPad Prism versiyon 8.0.0 (Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) kullanılarak istatistiksel olarak incelendi.

7. BULGULAR

7.1. Rekombinant DEK ve İnterlökin-8 ile Uyarılan Nötrofillerde NETosis

DEK proteininin NET oluşumu üzerindeki potansiyel etkisini incelemek için ilk olarak sağlıklı nötrofillerin rekombinant DEK (rDEK) ile uyarılıp uyarılmadığı test edildi. Bunun için sağlıklı bireylerden elde edilen nötrofiller daha önce endotoksin taşımadığı belirtilmiş ticari olarak temin edilen rDEK ile uyarıldıktan sonra hücre dışı DNA'ya bağlanan Sytox green ve bir NETosis belirteci olan NE ile immünofloresan boyanmıştır. rDEK'e ek olarak sağlıklı nötrofiller CXCR1/2 reseptörleri aracılığıyla NET oluşumunu tetiklediği bilinen rekombinant interlökin-8 (rIL-8) ve CXCR1/2'den bağımsız bir şekilde NET oluşturan PMA ile uyarılmıştır. Konfokal mikroskopu ile incelenen nötrofillerde rDEK, rIL-8 ve PMA ile muamelenin hem hücre dışı DNA hem de NE miktarını arttırdığı görüntülenmiştir (**Şekil 7.1**).

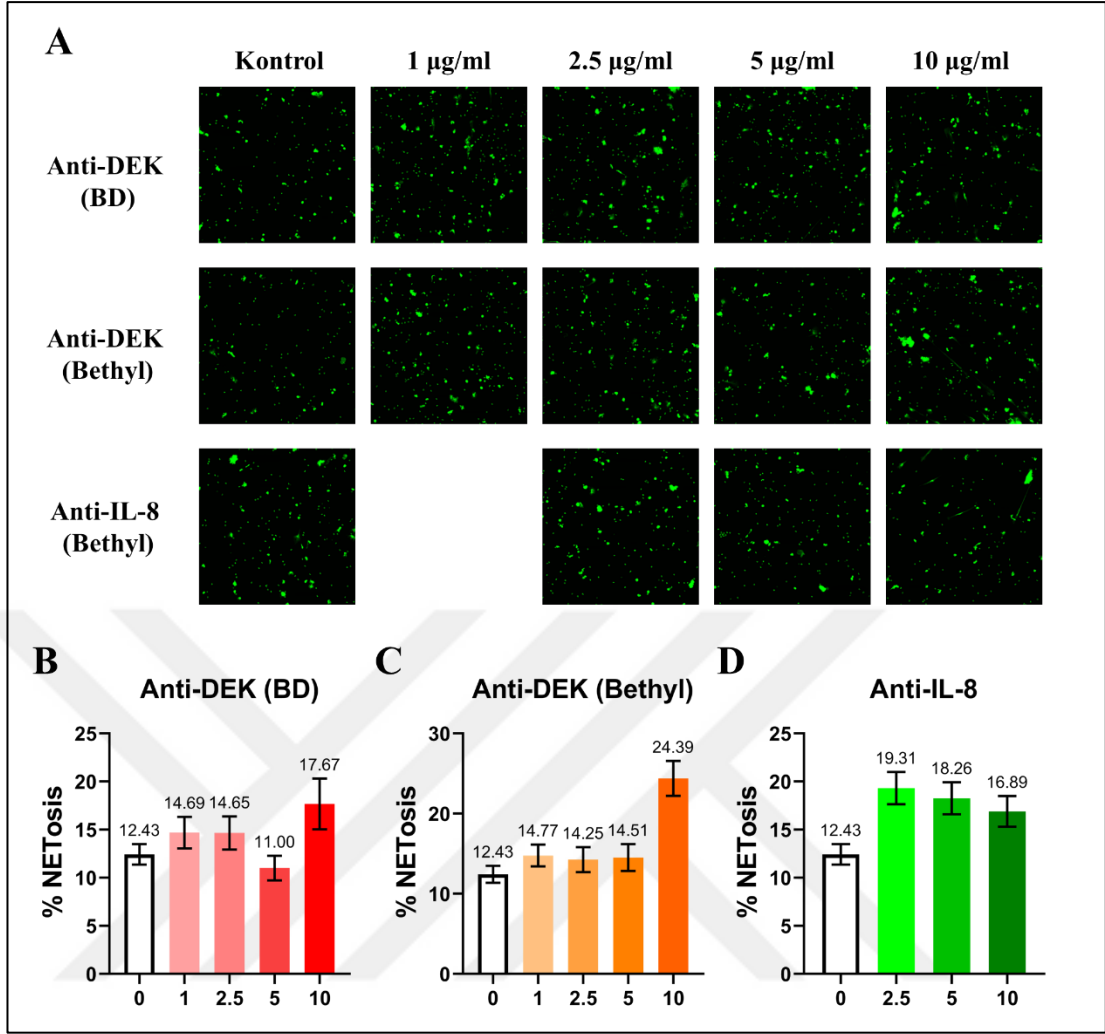


Şekil 7.1: rDEK ve rIL-8 ile uyarılan nötrofillere ait konfokal mikroskop görüntüleri. Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 1 saat boyunca rDEK (5 µg/ml), rIL-8 (100 ng/ml) ya da PMA (100 nM) ile uyarılmıştır. Hücre dışı DNA Sytox green (yeşil) ve fiksasyon ardından anti-nötrofil elastaz (NE, mavi) ile boyanmıştır. İmmüno Floresan örnekleri 200X büyütme ile konfokal mikroskopta görüntülenmiştir.

7.2. Anti-DEK ve Anti-IL-8 Antikorlarının NETosis'e Etkisi

rDEK'in NETosis oluşturma kapasitesini doğrulamak amacıyla anti-DEK antikorları kullanılarak NET oluşumunun baskılanmasına karar verildi. Bunun için ilk olarak ticari olarak elde antikorların nötrofiller üzerindeki etkisi test edildi. Deneylerde iki farklı anti-DEK antikor kullanıldı. İlki BD Bioscience firmasından satın alınan insan DEK proteininin 19.-169. amino asitleri arasındaki bölgeye reaktivite gösteren fare IgG1 izotipindeki anti-DEK antikorudur (anti-DEK (BD)). İkinci antikor ise Bethyl Laboratories firmasından satın alınan insan DEK proteininin 225.-275. amino asitleri bölgesine reaktivite gösteren tavşan IgG izotipindeki anti-DEK antikorudur (anti-DEK (Bethyl)). Ayrıca kontrol olarak insan IL-8 proteininin Ser28- Ser99 amino asitlerine reaktivite gösteren fare IgG1 izotipinde nötralize edici etkisi daha önce gösterilmiş olan anti-IL-8 antikorunu da kullanılmıştır.

Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller farklı konsantrasyonlarda anti-DEK (1-10 µg/ml) ve anti-IL-8 (2,5-10 µg/ml) antikorları ile muamele edildi ve Sytox green boyaması ardından konfokal mikroskobu ile 5 bağımsız alandan görüntülendikten sonra DANA I yöntemi ile analiz edildi (**Şekil 7.2**). Anti-DEK antikorları ile muamele edilen nötrofillerde 1-5 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda yaklaşık %10-20 aralığında bir NETosis değişimi görülürken, 10 µg/ml anti-DEK (BD) ve anti- DEK (Bethyl) antikor muamelesinde NETosis oranının sırasıyla %42 ve %96 arttığı görülmüştür (**Şekil 7.2 A-C**). Anti-IL-8 antikoru ile muamele edilen nötrofillerde ise 2,5 µg/ml konsantrasyonda %55'lik artış olmasına rağmen artan konsantrasyonlarda bu artışın azaldığı görülmektedir (**Şekil 7.2 A, D**). Tüm antikor muameleleri incelendiğinde istenmeyen NET oluşumlarını minimumda tutarak rDEK ile uyarılan sağlıklı nötrofillerin NETosis'ini inhibe etmek amacıyla tüm antikorların 2,5 µg/ml konsantrasyonda kullanılmasına karar verildi.



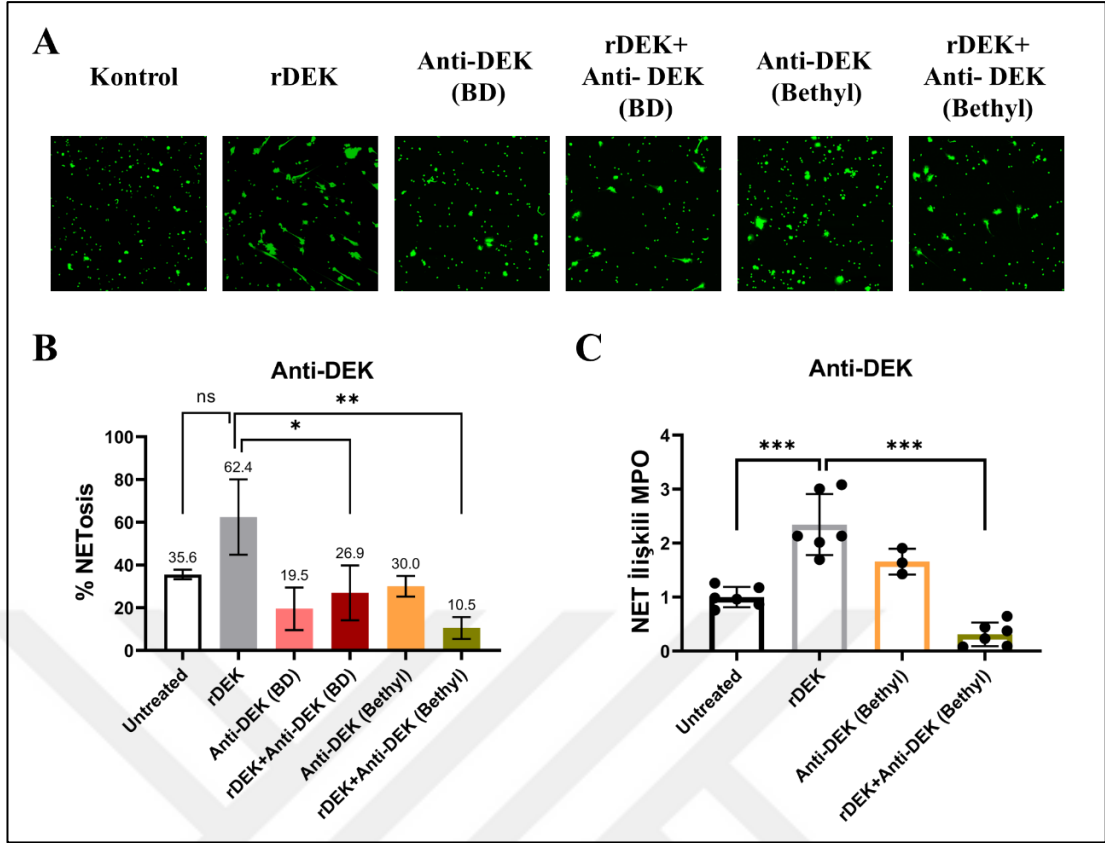
Şekil 7.2: Anti-DEK ve Anti-IL-8 antikorlarının sağlıklı nötrofiller üzerindeki etkilerinin incelenmesi. (A-D) sağlıklı bireylerden elde edilen nötrofiller 1 saat boyunca 1-10 µg/ml anti-DEK (BD), 1-10 µg/ml anti-DEK (Bethyl) ya da 2,5-10 µg/ml anti-IL-8 antikorları ile muamele edildikten sonra Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan konfokal mikroskopta 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B-D) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. Grafikler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

7.3. rDEK ve rIL-8 ile Uyarılan NETosis'in Anti-DEK ve Anti-IL-8 Antikorları ile Baskılanması

NET oluşumunda DEK proteininin rolünü doğrulamak amacıyla rDEK ile uyarılan nötrofillerde NETosis'in anti-DEK antikorları ile baskılanıp baskılanamayacağı test edildi. Bunun için sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller anti-DEK antikorları ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra rDEK ile NET oluşumu için uyarıldı. Sytox green

görüntülerinden analiz edilen NETosis oranlarına göre rDEK muamelesinin kontrolden, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, 1.75 kat daha fazla NET oluşturduğu; anti-DEK (BD) ve anti-DEK (Bethyl) antikorları muamelelerinin ise rDEK ile uyarılan NETosisi sırasıyla 2.3 ve 5.9 kat azalış ile, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, kontrol hücrelerden bile daha düşük bir NETosis seviyesine kadar inhibe etmiştir (Şekil 7.3 A-B). NET ilişkili MPO analizlerine göre ise rDEK'in NETosis oranını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 2.34 kat arttırdığı, anti-DEK (Bethyl) antikorunun da rDEK ile uyarılan NETosis miktarını istatistiksel olarak anlamlı biçimde 7.5 kat azalttığı ve kontrolün de altında NETosis seviyelerine kadar inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 7.3 C).

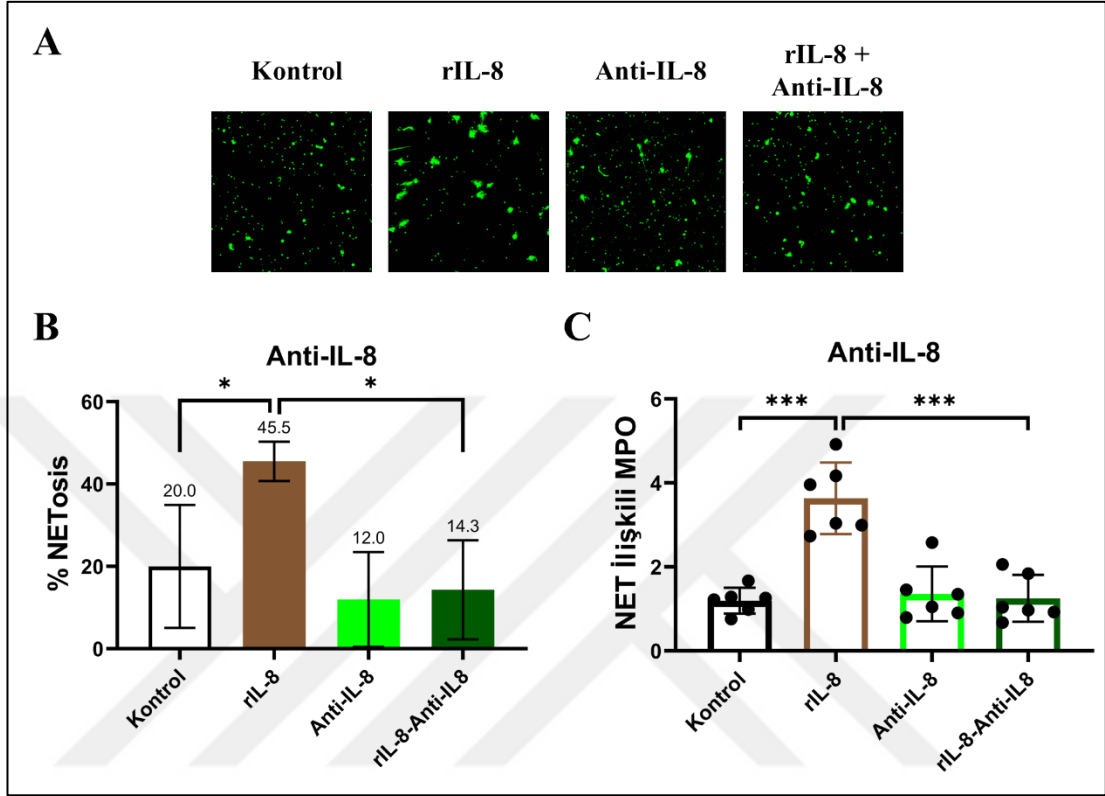




Şekil 7.3: rDEK ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunun anti-DEK antikorları ile baskılanması. (A-C) sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 15 dakika boyunca 2,5 µg/ml anti-DEK (BD) ve 2,5 µg/ml anti-DEK (Bethyl) ile inkübe edildikten sonra 1 saat boyunca 3,5 µg/ml rDEK ile uyarılmıştır. (A, B) Ardından nötrofiller Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan konfokal mikroskopta 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır. (C) Paralel olarak gerçekleştirilen NET ilişkili MPO seviyesi analizi. Sonuçlar 2 bağımsız deneyin ortalamasıdır. Her örnek ilgili deneydeki kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Grafikler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (*p<0.05, **p<0.01)

rDEK deneylerine benzer şekilde rIL-8 ile uyarılan nötrofillerde de anti-IL-8 ile NETosis baskılanması test edilmiştir. Sytox green görüntülerinden analiz edilen NETosis oranlarına göre rIL-8'in kontrolden istatistiksel olarak anlamlı biçimde 2.27 kat daha fazla NET oluşturduğu; anti-IL-8 antikor muamelesinin ise rIL-8 ile uyarılan NETosisi 3.18 kat azalış ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, kontrol hücrelerden bile daha düşük bir NETosis seviyesine kadar inhibe ettiği bulunmuştur (Şekil 7.4 A-B). NET ilişkili MPO analizlerine göre ise rIL-8'in NETosis oranını istatistiksel olarak

anlamli bir sekilde 3.04 kat arttirdigi, anti-IL-8 antikorunun da rIL-8 ile uyarilan NETosis miktarini istatistiksel olarak anlamli bicimde 2.9 kat azalttigi gorulmüstür (Sekil 7.4 C).

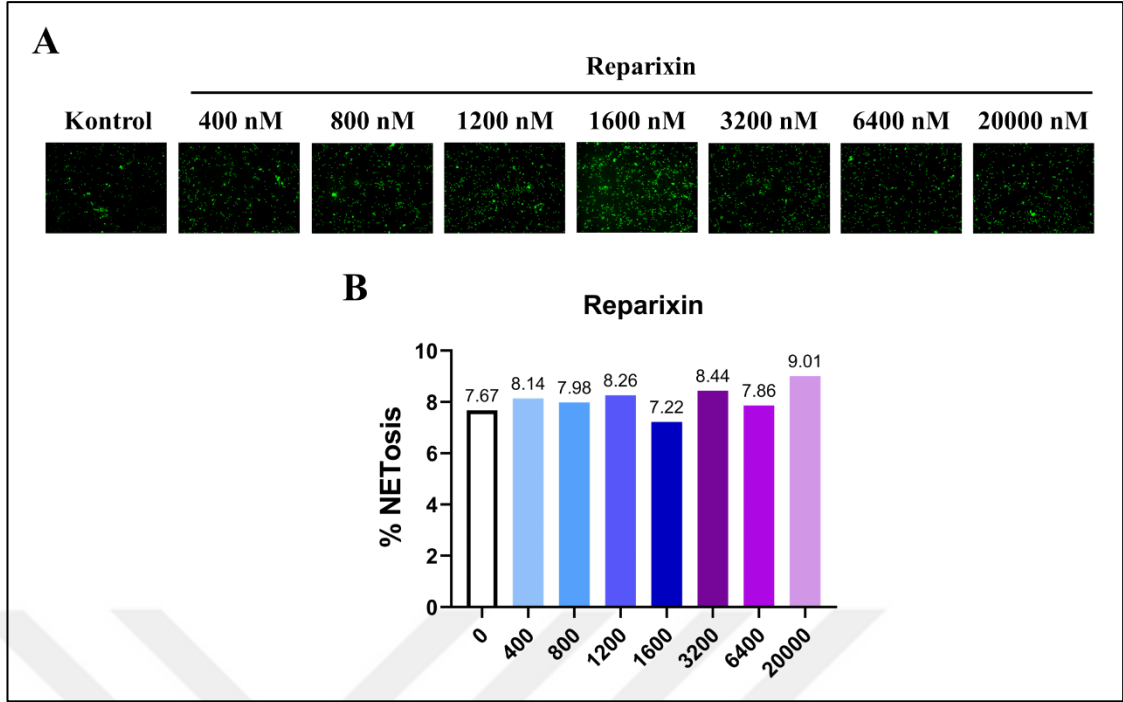


Şekil 7.4: rIL-8 ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunun anti-IL-8 antikoru ile baskılanması. (A-C) sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 15 dakika boyunca 2,5 µg/ml anti-IL-8 ile inkübe edildikten sonra 1 saat boyunca 100 ng/ml rIL-8 ile uyarılmıştır. (A, B) Ardından nötrofiller Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan konfokal mikroskopta 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır. (C) Paralel olarak gerçekleştirilen NET ilişkili MPO seviyesi analizi. Sonuçlar 2 bağımsız deneyin ortalamasıdır. Her örnek o deneydeki kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Grafikler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (*p<0.05, ***p<0.001)

7.4. rDEK ve rIL-8 ile Uyarılan NETosis'in Reparixin ile Baskılanması

DEK proteininin, IL-8 gibi kemokinlerin CXCR1/2 reseptörlerine bağlanmasına aracılık eden ELR motifine sahip olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak daha önce yapılan çalışmalarda DEK proteininin HKH'lerdeki CXCR2'ye bağlanarak bu hücrelerin proliferasyonunu regüle edile ettiği gösterilmiştir. Bu bilgiler göz önüne alındığında DEK'in nötrofillerin yüzeyinde de bulunan CXCR1 ve CXCR2 reseptörlerine bağlanarak, nötrofilleri NETosis için uyurabileceği hipotezini ortaya atmamızı sağladı.

Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller farklı konsantrasyonlarda Reparixin (0,4–20 μ M) ile muamele edildi ve Sytox green boyaması ardından konfokal mikroskopu ile 5 bağımsız alandan görüntülendikten sonra DANA I yöntemi ile analiz edildi (**Şekil 7.5**). Reparixin ile muamele edilen nötrofillerde konsantrasyon artmasına rağmen kontrole göre en fazla 1.17 katlık (20 μ M Reparixin) bir artış görülmüştür (**Şekil 7.5**). Belirgin bir artış olmamasına rağmen minimum konsantrasyonda maksimum etkiyi görebilmek adına sonraki deneylerde 200 nM ve 400 nM Reparixin ile devam edilmesine karar verilmiştir.

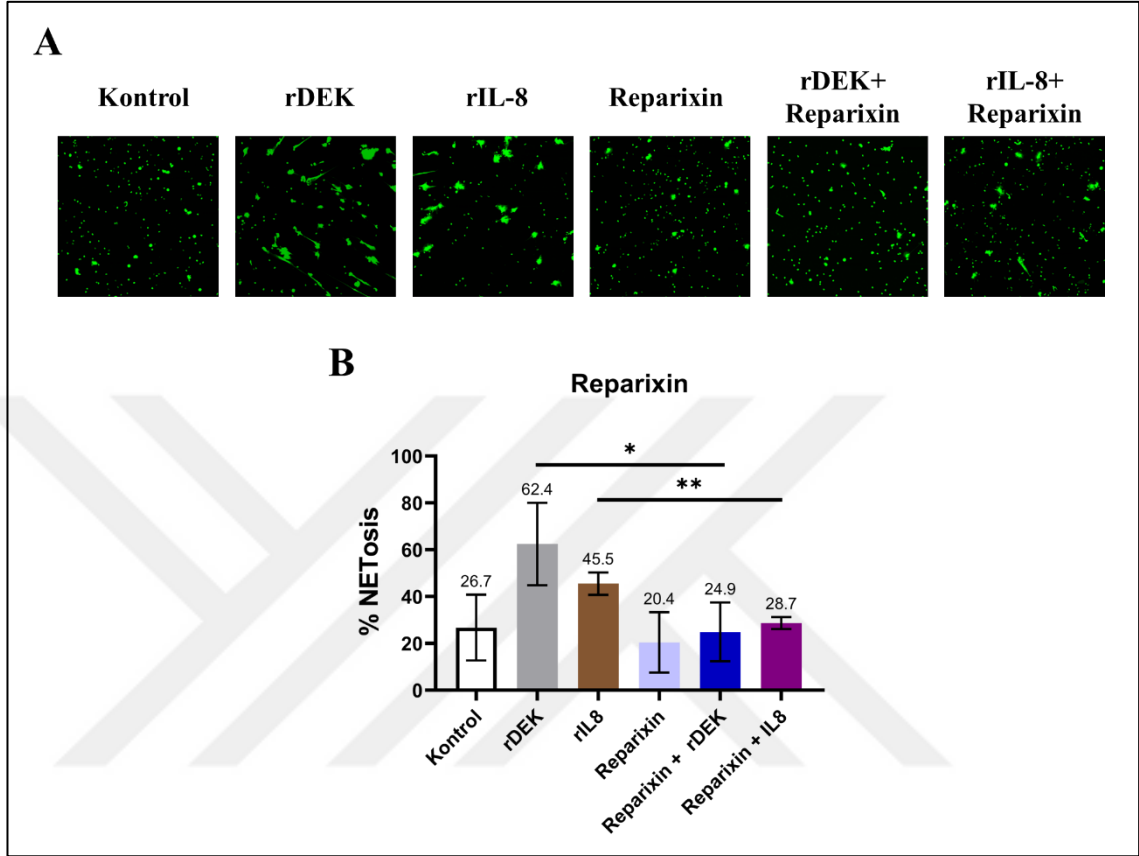


Şekil 7.5: Reparixin'in sağlıklı nötrofiller üzerindeki etkilerinin incelenmesi. (A, B) sağlıklı bireylerden elde edilen nötrofiller 1 saat boyunca 0,4-20 μ M reparixin ile muamele edildikten sonra Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan konfokal mikroskopta 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi.

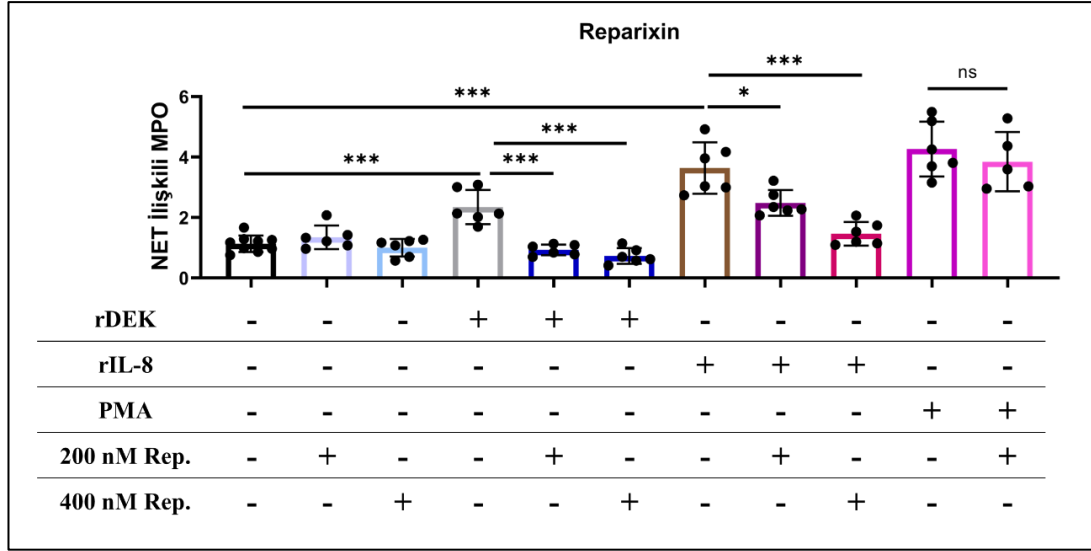
Sunulan hipotezi test etmek için rDEK ile uyarılan nötrofillerde CXCR1/2 allosterik inhibitörü Reparixin'in NETosis üzerindeki etkisi incelendi. rIL-8 ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunun Reparixin ile inhibe edildiği bilindiğinden deneylerde Reparixin inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Buna ek olarak PMA, CXCR1/2'den bağımsız bir şekilde NETosis tetiklediğinden Reparixin ile baskılanmayacağı için deneylerde Reparixin kaynaklı NETosis inhibisyonu için negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 200 nM Reparixin ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra rDEK ve rIL-8 ile NET oluşumu için uyarıldı. Sytox green görüntülerinin analizine göre Reparixin ile ön inkübasyon rDEK ve rIL-8 ile uyarılan nötrofillerdeki NET oluşumunu sırasıyla 2.5 kat ve 2.17 kat, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.6**). NET ilişkili MPO analizlerine göre ise hem 200 nM hem de 400 nM Reparixin ile ön inkübasyonun rDEK ile uyarılan nötrofillerdeki NET oluşumunu sırasıyla 2.52 kat ve 3.22 kat; rIL-8 ile uyarılan nötrofillerdeki NET

oluşumunu ise sırasıyla 1.46 kat ve 2.48 kat, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, azaltmıştır. Buna rağmen Reparixin'in PMA ile uyarılan NETosis üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisi görülmemiştir (Şekil 7.7).



Şekil 7.6: rDEK ve rIL-8 ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunun Reparixin ile baskılanması. (A, B) sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 15 dakika boyunca 200 nM Reparixin ile inkübe edildikten sonra 1 saat boyunca 3,5 µg/ml rDEK ya da 100 ng/ml rIL-8 ile uyarılmıştır. (A, B) Ardından nötrofiller Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan konfokal mikroskopta 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır. Grafikler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (*p<0.05, **p<0.01)



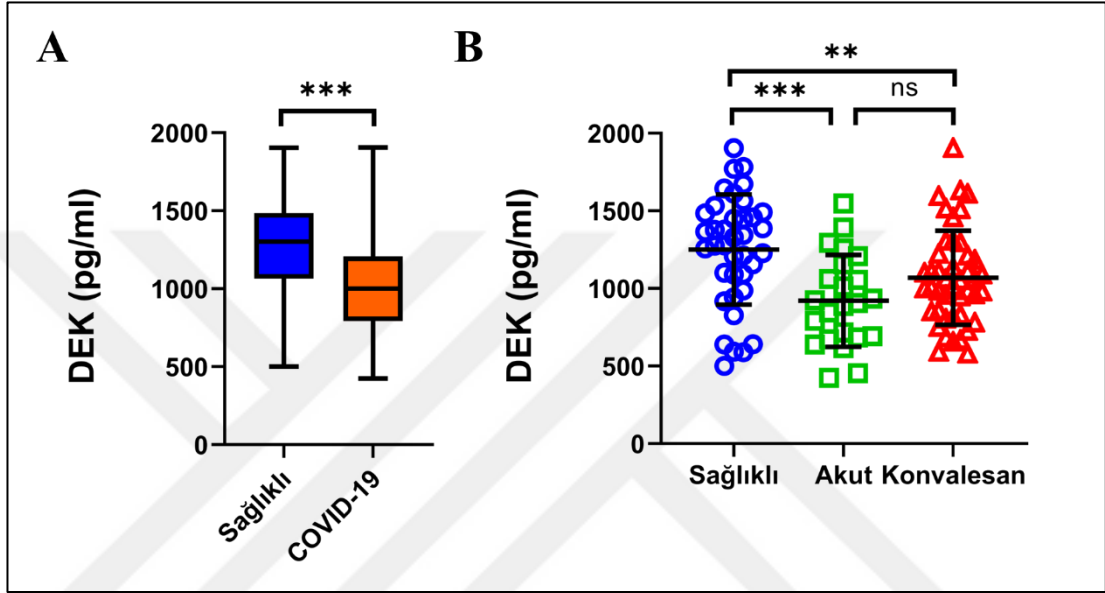
Şekil 7.7: Reparixin ön inkübasyonunun rDEK ve rIL-8 ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunu baskılamasının NET ilişkili MPO yöntemiyle belirlenmesi. Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 15 dakika boyunca 200 nM ya da 400 nM Reparixin ile inkübe edildikten sonra 1 saat boyunca 3,5 µg/ml rDEK, 100 ng/ml rIL-8 ya da 100 nM PMA ile uyarılmıştır. Oluşan NETosis seviyesinin NET ilişkili MPO ile analizi. Sonuçlar 2 bağımsız deneyin ortalamasıdır. Her örnek o deneydeki kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Grafikler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (*p<0.05, ***p<0.001)

7.5. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK, IL-8, IL-6, IL-1β ve NETosis Belirteçlerinin İncelenmesi

Yapılan çalışmalarda COVID-19 hastası bireylerin serumlarında MPO ve Cit-H3 gibi NETosis belirteçlerinin anlamlı oranda arttığı tespit edilmiştir. DEK proteininin de ortaya çıkarılan veriler dahilinde NETosis üzerindeki olası tetikleyici etkisi göz önüne alındığında, DEK proteini ile NETosis belirteçleri ve inflamatuvar sitokinler arasındaki ilişki COVID-19 hasta serumlarında incelendi. Bu amaçla sağlıklı gönüllülerden ve COVID-19 hastası bireylerden periferik kan materyali toplanarak serum izole edildi. Ardından ticari olarak satın ELISA kitleri kullanılarak konsantrasyonlar tespit edildi.

Yapılan ELISA testlerine göre serumdaki DEK konsantrasyonu COVID-19 hastalarında (1018 ± 38 pg/ml) sağlık bireylere (1251 ± 58 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. Sonrasında daha detaylı inceleme için COVID-19 hasta serumları, hastaların kan alındığında bulduklarının hastalık evresine göre

akut ve konvalesan olarak ayrıldı. Bu gruplandırma sonucunda hem akut (920 ± 62 pg/ml) hem de konvalesan (1070 ± 46 pg/ml) evredeki COVID-19 serumlarında sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha az DEK konsantrasyonu olduğu görüldü. Ayrıca akut evreden konvalesan evreye COVID-19 aktivitesi azaldıkça DEK miktarı ortalama %10'luk bir artış sağlasa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 7.8).



Şekil 7.8: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki DEK konsantrasyonları. **(A)** Sağlıklı gönüllülerden (n=38) ve COVID-19 hastalarından (n=67) toplanan serum örneklerindeki DEK konsantrasyonu ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. **(B)** COVID-19 bireyler hastalığın bulunduğu faza göre akut (n=23) ve konvalesan (n=44) olarak gruplandırıldığında ortaya çıkan DEK konsantrasyonu dağılımı gösterilmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (**p<0.01, ***p<0.001)

7.5.1. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve IL-8 İlişkisi

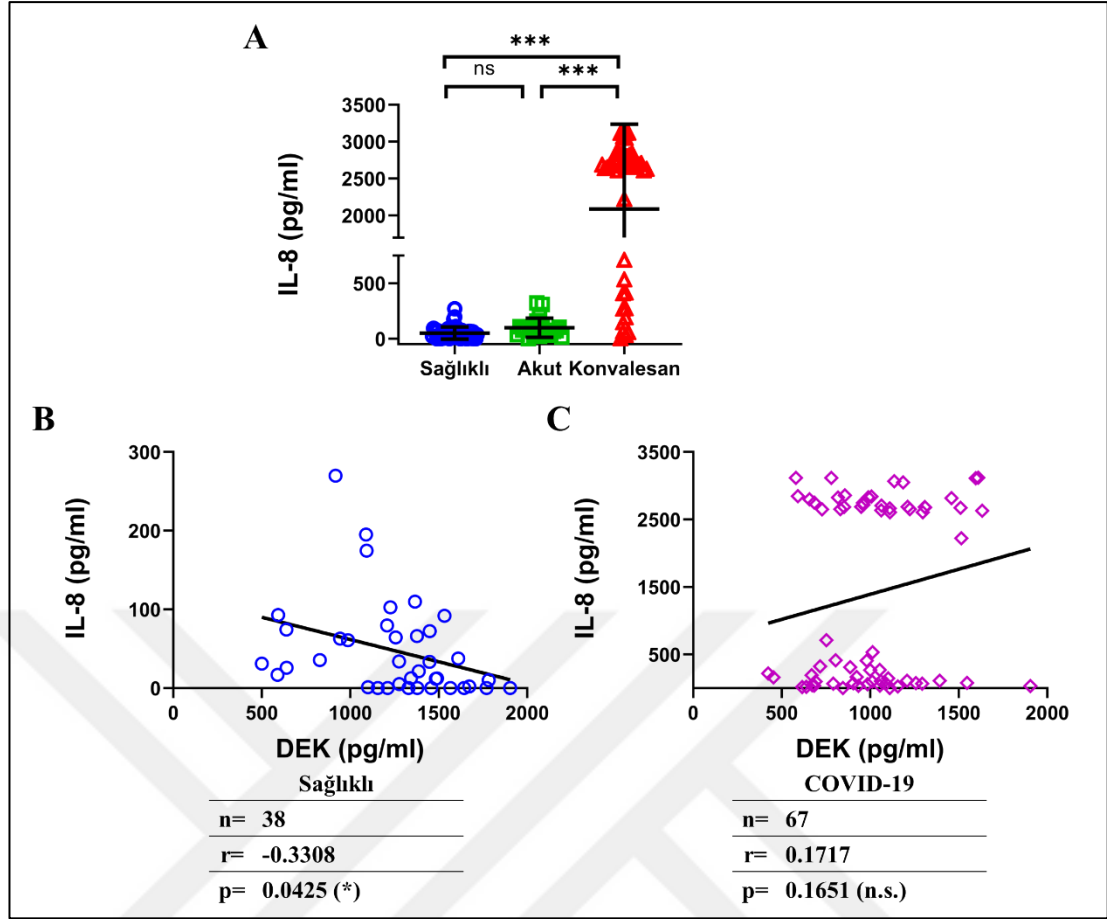
Yapılan ELISA testlerine göre serumdaki IL-8 konsantrasyonu COVID-19 hastalarında (1404 ± 162 pg/ml) sağlık bireylere (50 ± 8 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde artmıştır. Daha detaylı inceleme için yapılan gruplandırma sonrası, sağlıklı bireylerin serumundaki IL-8 ile karşılaştırıldığında akut evrede (98 ± 18 pg/ml) 1.94 katlık istatistiksel olarak anlamlı olmayan, konvalesan evrede (2087 ± 173 pg/ml) ise 41.4 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Ayrıca COVID-

19 hastalığındaki akut ve konvalesan evre karşılaştırıldığında da 21.2 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir (**Şekil 7.9 A**).

Sağlıklı bireylerdeki ve COVID-19 hasta serumlarındaki DEK ve IL-8 konsantrasyonları arasındaki olası ilişkiler Pearson korelasyonu ile analiz edildi (**Tablo 7.1**). Bu analizler sonucunda DEK ve IL-8 arasında sağlıklı bireylerin serumlarında istatistiksel olarak anlamlı orta seviyede negatif korelasyon bulunmasına rağmen akut ve konvalesan tüm COVID-19 serumlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir (**Şekil 7.9 B-C**).

Tablo 7.1: Serum örneklerinde DEK proteini ile IL-8 sitokini arasındaki ilişki. Sağlıklı bireyler ve COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerinde DEK proteini ve IL-8 sitokini ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir ve aralarındaki korelasyon Graphpad 8.0.2 kullanılarak Pearson korelasyonları gösterilmektedir.

Grup	Pearson r	Örnek Sayısı	P değeri	Ortalama	Standart Sapma
Sağlıklı	-0.3308	38	0.0425 (*)	50.36	54.71
Akut	-0.1839	23	0.4009 n.s.	98.13	86.53
Konvalesan	0.01655	44	0.9151 n.s.	2087	1150
Akut ve Konvalesan	0.1717	67	0.1651 n.s.	1404	1330



Şekil 7.9: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki IL-8 konsantrasyonları. **(A)** Sağlıklı gönüllüler (n=47) ile akut (n=23) ve konvalesan (n=44) COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerindeki IL-8 konsantrasyonu ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (***) $p < 0.001$ **(B)** sağlıklı gönüllülerdeki ve **(C)** akut ve konvalesan fazdaki tüm COVID-19 hastası bireylerin serumlarındaki DEK proteini ve IL-8 sitokoni arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile değerlendirilmiştir.

7.5.2. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve IL-6 İlişkisi

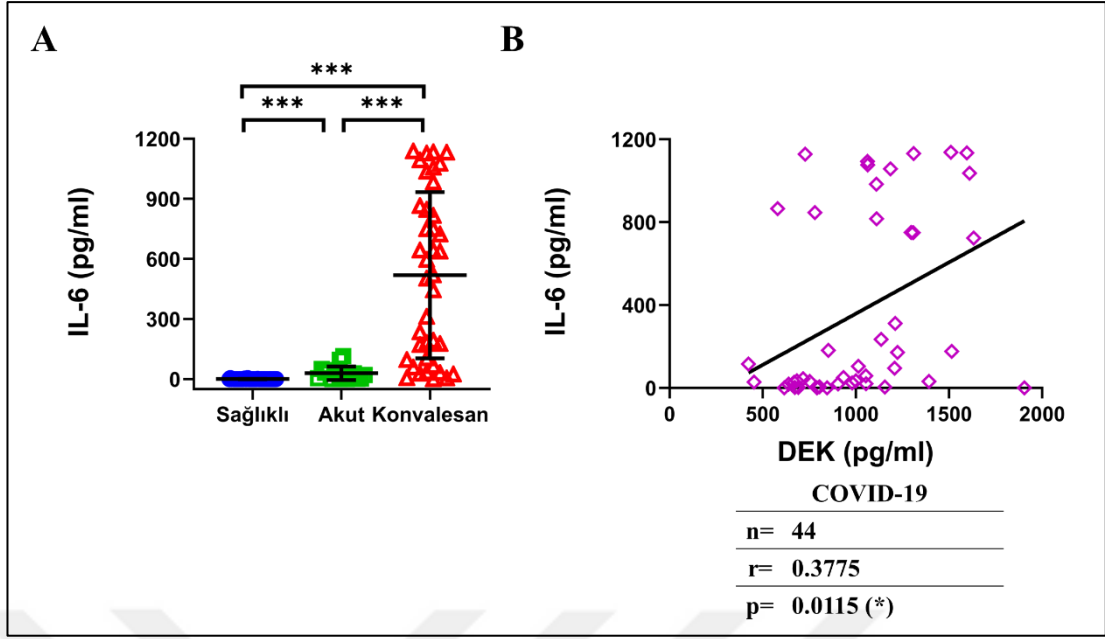
Yapılan ELISA testlerine göre serumdaki IL-6 konsantrasyonu COVID-19 hastalarında (377 ± 56 pg/ml) sağlıklı bireylere (0.3 ± 0.15 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde artmıştır. Daha detaylı inceleme için yapılan gruplandırma sonrası, sağlıklı bireylerin serumundaki IL-6 ile karşılaştırıldığında akut evrede (29 ± 9 pg/ml) 96.6 katlık, konvalesan evrede (519 ± 66 pg/ml) ise 1730 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Ayrıca COVID-19 hastalığındaki akut ve

konvalesan evre karşılaştırıldığında 17.9 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir (**Şekil 7.10 A**).

Sağlıklı bireylerdeki ve COVID-19 hasta serumlarındaki DEK ve IL-6 konsantrasyonları arasındaki olası ilişkiler Pearson korelasyonu ile analiz edildi (**Tablo 7.2**). Bu analizler sonucunda DEK ve IL-6 arasında sağlıklı bireylerin serumlarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmamasına rağmen akut ve konvalesan tüm COVID-19 serumları birlikte incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı orta seviye pozitif korelasyon tespit edilmiştir (**Şekil 7.10 B**).

Tablo 7.2: Serum örneklerinde DEK proteini ile IL-6 sitokini arasındaki ilişki. Sağlıklı bireyler ve COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerinde DEK proteini ve IL-6 sitokini ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir ve aralarındaki korelasyon Graphpad 8.0.2 kullanılarak Pearson korelasyonları gösterilmektedir.

Grup	Pearson r	Örnek Sayısı	P değeri	Ortalama	Standart Sapma
Sağlıklı	-0.2095	38	0.2068 n.s.	0.3364	1.073
Akut	-0.0149	16	0.9563 n.s.	29.3	34.16
Konvalesan	0.1830	28	0.3513 n.s.	519	415.1
Akut ve Konvalesan	0.3775	44	0.0115 (*)	376.6	414.7



Şekil 7.10: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki IL-6 konsantrasyonları. **(A)** Sağlıklı gönüllüler (n=47) ile akut (n=16) ve konvalesan (n=49) COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerindeki IL-6 konsantrasyonu ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (***) $p < 0.001$ **(B)** akut ve konvalesan fazdaki tüm COVID-19 hastası bireylerin serumlarındaki DEK proteini ve IL-6 sitokini arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile değerlendirilmiştir.

7.5.3. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve IL-1 β İlişkisi

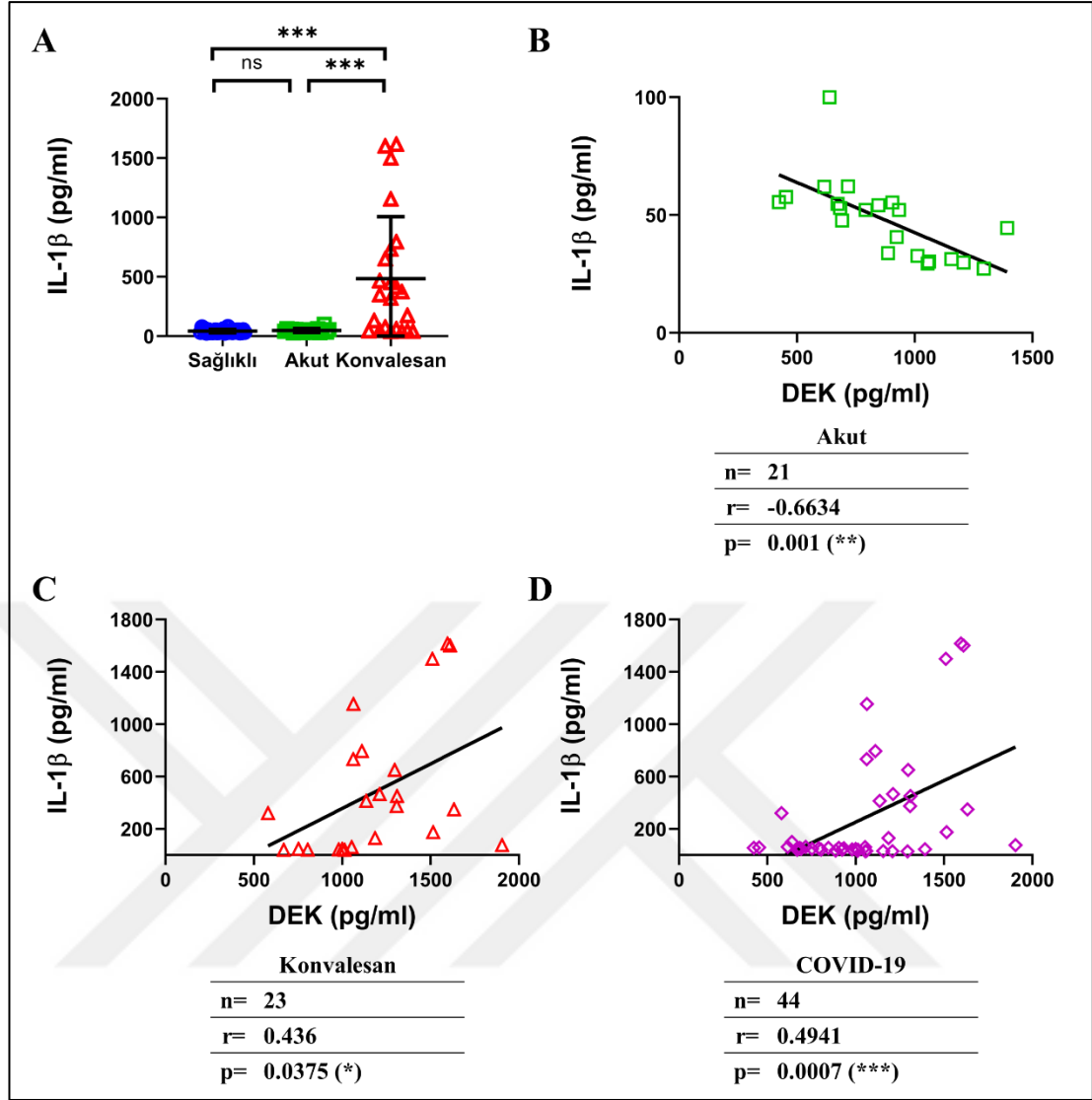
Yapılan ELISA testlerine göre serumdaki IL-1 β konsantrasyonu COVID-19 hastalarında (276 ± 76 pg/ml) sağlık bireylere (43 ± 3 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde artmıştır. Daha detaylı inceleme için yapılan gruplandırma sonrası, sağlıklı bireylerin serumundaki IL-1 β ile karşılaştırıldığında akut evrede (48 ± 4 pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmamasına rağmen, konvalesan evrede (484 ± 109 pg/ml) 11 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Ayrıca COVID-19 hastalığındaki akut ve konvalesan evre karşılaştırıldığında da 10 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir (**Şekil 7.11 A**).

Sağlıklı bireylerdeki ve COVID-19 hasta serumlarındaki DEK ve IL-1 β konsantrasyonları arasındaki olası ilişkiler Pearson korelasyonu ile analiz edildi (**Tablo 7.3**). Bu analizler sonucunda DEK ve IL-1 β arasında sağlıklı bireylerin

serumlarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunamamıştır. COVID-19 hastası bireylerden alınan serumlar birlikte incelendiğinde pozitif orta derece bir korelasyon görülmesine rağmen hastalığın farklı evrelerinde farklı korelasyonlar görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı bir şekilde akut evredeki serum örneklerinde yüksek negatif korelasyon görülürken, konvalesan evrede DEK proteininin ile IL-1 β arasında pozitif orta derece korelasyon görülmüştür (Şekil 7.11 B-D).

Tablo 7.3: Serum örneklerinde DEK proteini ile IL-1 β sitokini arasındaki ilişki. Sağlıklı bireyler ve COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerinde DEK proteini ve IL-1 β sitokini ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir ve aralarındaki korelasyon Graphpad 8.0.2 kullanılarak Pearson korelasyonları ile gösterilmektedir.

Grup	Pearson r	Örnek Sayısı	P değeri	Ortalama	Standart Sapma
Sağlıklı	-0.2666	21	0.2427 n.s.	43.2	14.87
Akut	-0.6634	21	0.001 (**)	47.87	16.8
Konvalesan	0.436	23	0.0375 (*)	483.5	522
Akut ve Konvalesan	0.4941	44	0.0007 (***)	275.6	433.5



Şekil 7.11: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki IL-1 β konsantrasyonları. **(A)** Sağlıklı gönüllüler (n=30) ile akut (n=21) ve konvalesan (n=23) COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerindeki IL-1 β konsantrasyonu ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (***) $p < 0.001$ Sırasıyla **(B)** akut ve **(C)** konvalesan faz ile **(D)** tüm COVID-19 hastası bireylerin serumlarındaki DEK proteini ve IL-1 β sitokoni arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile değerlendirilmiştir.

7.5.4. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve MPO İlişkisi

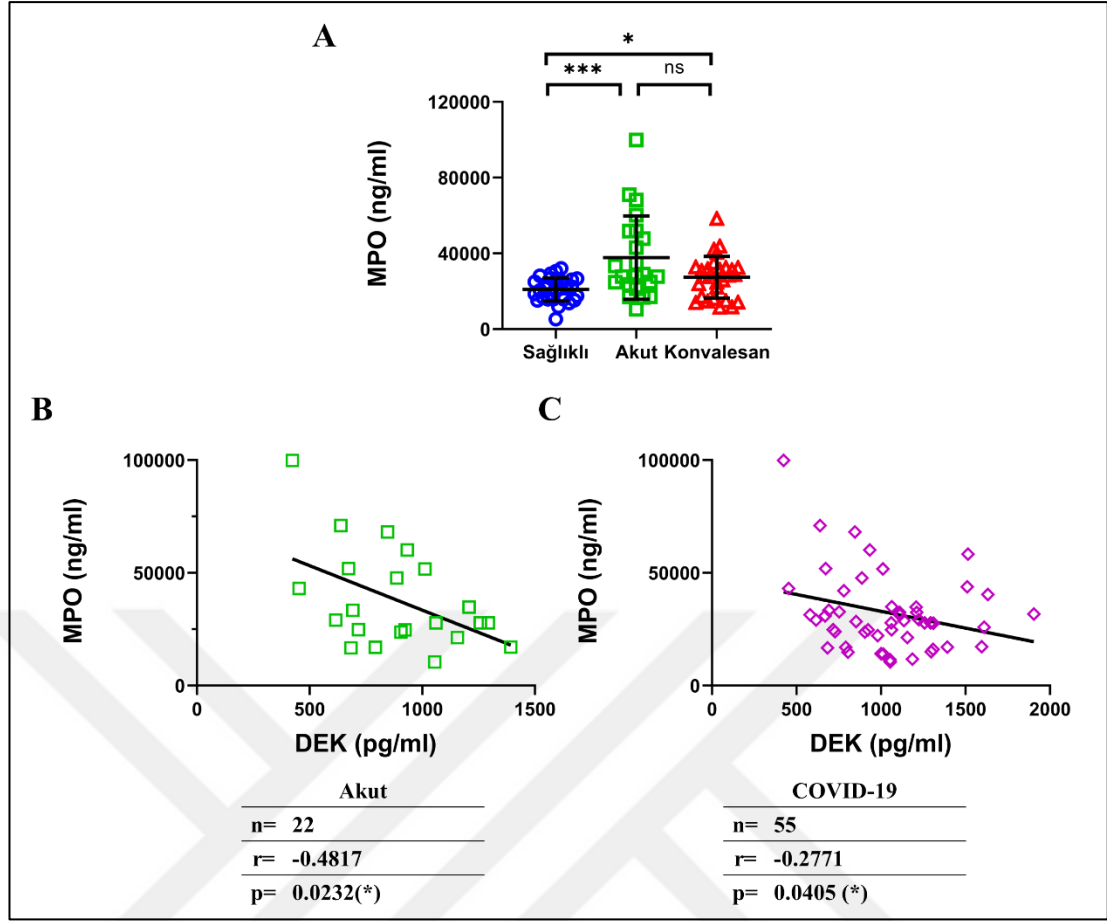
Yapılan ELISA testlerine göre serumdaki MPO konsantrasyonu COVID-19 hastalarında (32 ± 2 ng/ml) sağlık bireylere (20 ± 6 ng/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde artmıştır. Daha detaylı inceleme için yapılan gruplandırma sonrası,

sağlıklı bireylerin serumundaki MPO ile karşılaştırıldığında kovalesan evrede (27 ± 2 ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmamasına rağmen, akut evrede (38 ± 5 ng/ml) 1.9 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Ayrıca COVID-19 hastalığındaki akut ve kovalesan evre karşılaştırıldığında kovalesan evrede istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalış görülmektedir (**Şekil 7.12 A**).

Sağlıklı bireylerdeki ve COVID-19 hasta serumlarındaki DEK ve MPO konsantrasyonları arasındaki olası ilişkiler Pearson korelasyonu ile analiz edildi (**Tablo 7.4**). Bu analizler sonucunda DEK ve MPO arasında sağlıklı bireylerin serumlarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunamamıştır. COVID-19 hastası bireylerden alınan serumlar birlikte incelendiğinde negatif yönlü düşük korelasyon, akut örnekler tek başına incelendiğinde ise yine negatif yönlü orta dereceli istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir (**Şekil 7.12 B-C**).

Tablo 7.4: Serum örneklerinde DEK proteini ile MPO belirteci arasındaki ilişki. Sağlıklı bireyler ve COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerinde DEK ve MPO proteinleri ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir ve aralarındaki korelasyon Graphpad 8.0.2 kullanılarak Pearson korelasyonları gösterilmektedir.

Grup	Pearson r	Örnek Sayısı	P değeri	Ortalama	Standart Sapma
Sağlıklı	-0.7017	21	0.7625 n.s.	20.91	6.03
Akut	-0.4817	22	0.0232 (*)	37.71	21.99
Kovalesan	0.08203	33	0.6499 n.s.	27.39	11
Akut ve Kovalesan	-0.2771	55	0.0405 (*)	31.93	17.34



Şekil 7.12: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki MPO konsantrasyonları. **(A)** Sağlıklı gönüllüler (n=30) ile akut (n=22) ve konvalesan (n=28) COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerindeki MPO konsantrasyonu ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) Sırasıyla **(B)** akut faz ve **(C)** tüm COVID-19 hastası bireylerin serumlarındaki DEK proteini ve MPO arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile değerlendirilmiştir.

7.5.5. COVID-19 Hasta Serumlarında DEK ve Cit-H3 İlişkisi

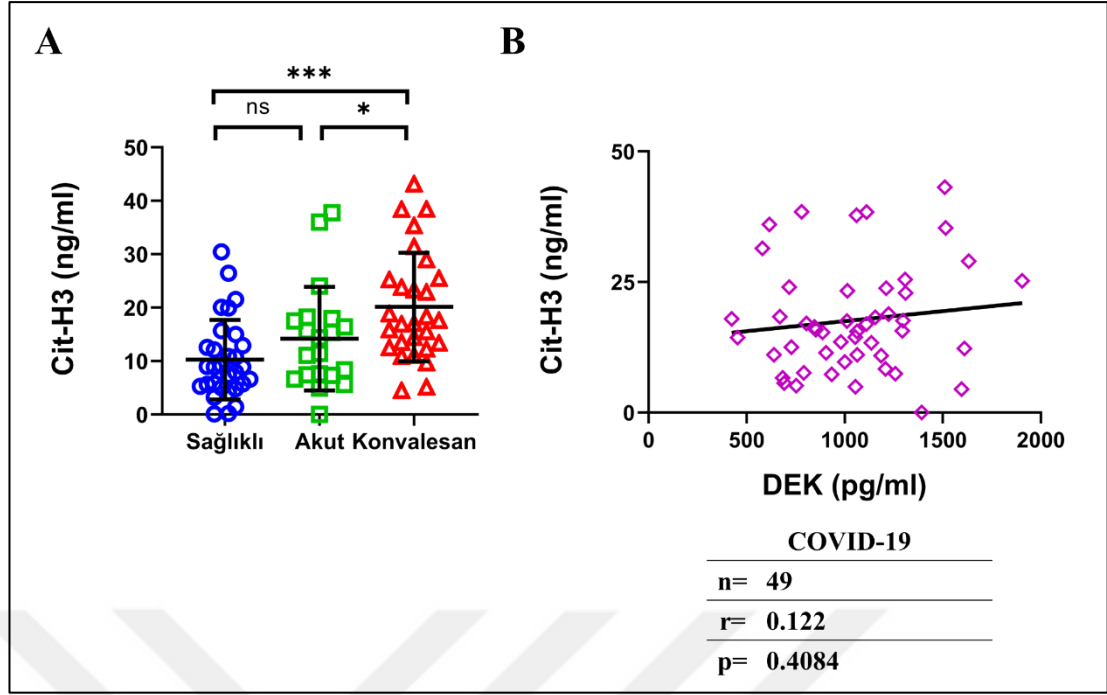
Yapılan ELISA testlerine göre serumdaki Cit-H3 konsantrasyonu COVID-19 hastalarında (18 ± 1 ng/ml) sağlık bireylere (10 ± 1 ng/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde artmıştır. Daha detaylı inceleme için yapılan gruplandırma sonrası, sağlıklı bireylerin serumundaki Cit-H3 ile karşılaştırıldığında akut evrede (14 ± 2 ng/ml) 1.38 katlık istatistiksel olarak anlamlı olmayan, konvalesan evrede (20 ± 2 ng/ml) ise 1.96 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Ayrıca COVID-

19 hastalığındaki akut ve konvalesan evre karşılaştırıldığında 1.41 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir (**Şekil 7.13 A**).

Sağlıklı bireylerdeki ve COVID-19 hasta serumlarındaki DEK ve Cit-H3 konsantrasyonları arasındaki olası ilişkiler Pearson korelasyonu ile analiz edildi (**Tablo 7.5**). Bu analizler sonucunda DEK ve Cit-H3 arasında hem sağlıklı bireylerin serumlarında hem de COVID-19 serumlarında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunamamıştır (**Şekil 7.13 B**).

Tablo 7.5: Serum örneklerinde DEK proteini ile Cit-H3 belirteci arasındaki ilişki. Sağlıklı bireyler ve COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerinde DEK ve Cit-H3 proteinleri ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir ve aralarındaki korelasyon Graphpad 8.0.2 kullanılarak Pearson korelasyonları gösterilmektedir.

Grup	Pearson r	Örnek Sayısı	P değeri	Ortalama	Standart Sapma
Sağlıklı	0.248	21	0.2784 n.s.	10.25	7.43
Akut	-0.2124	22	0.3427 n.s.	14.19	9.69
Konvalesan	0.1639	28	0.4048 n.s.	20.14	10.15
Akut ve Konvalesan	0.122	49	0.4084 n.s.	17.66	10.29

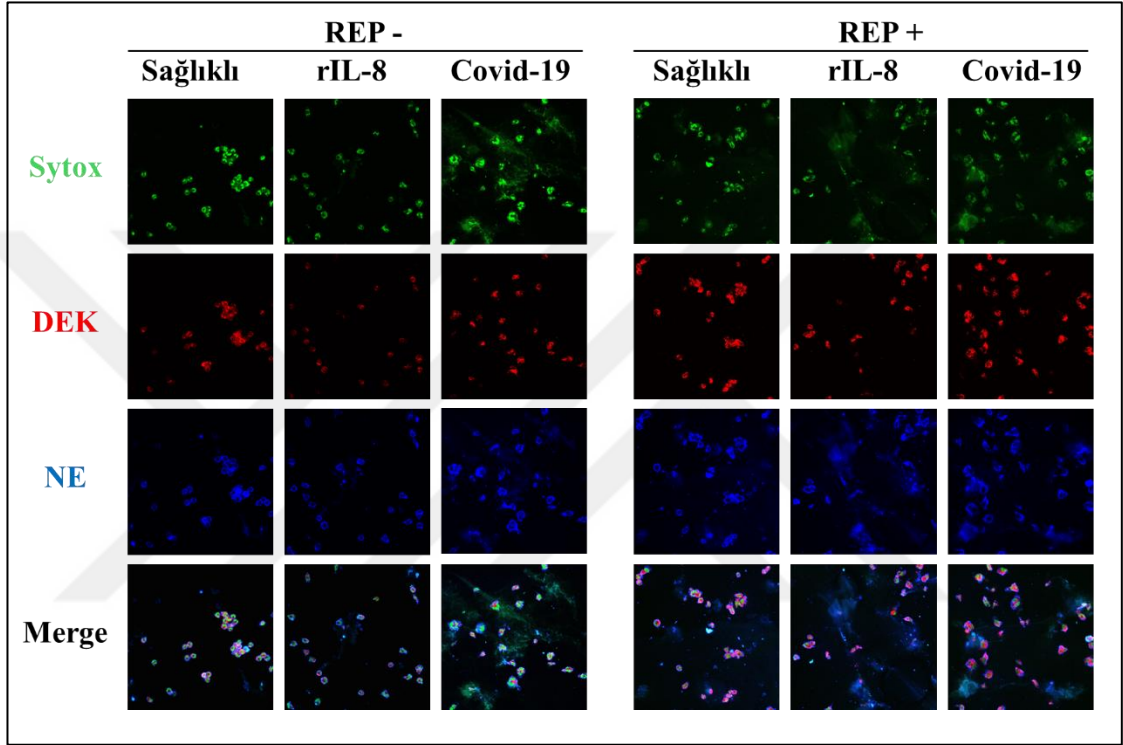


Şekil 7.13: Sağlıklı bireyler ile akut ve konvalesan fazdaki COVID-19 hastalarının serumlarındaki Cit-H3 konsantrasyonları. **(A)** Sağlıklı gönüllüler (n=30) ile akut (n=21) ve konvalesan (n=28) COVID-19 hastalarından toplanan serum örneklerindeki Cit-H3 konsantrasyonu ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) **(B)** akut ve konvalesan fazdaki tüm COVID-19 hastası bireylerin serumlarındaki DEK proteini ve Cit-H3 arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile değerlendirilmiştir.

7.6. COVID-19 Serumlarının Sağlıklı Nötrofillerde NET Oluşturma Kapasitesi

NETosis belirteçlerinin ve NET oluşumu ile ilişkilendirilebilecek bazı sitokinlerin COVID-19 hastalarından elde edilen serumlarında sağlıklı bireylerin serumlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Bu duruma ek olarak bu belirteçler ve sitokinler ile DEK proteini arasında pozitif ya da negatif korelasyonlara sahip olması COVID-19 hastalarının serumları ile uyarılan sağlıklı nötrofillerdeki NET oluşumunda DEK proteinin rolü ve etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu etkiyi test etmek için sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller Reparixin ile ön inkübasyonun ardından sağlıklı birey serumu, COVID-19 birey serumu ya da pozitif kontrol olarak rIL-8 ile uyarılmıştır. Ardından NET oluşumu Sytox green, NE ve DEK proteini immüno Floresan boyamaları ile konfokal mikroskopisi yapılarak

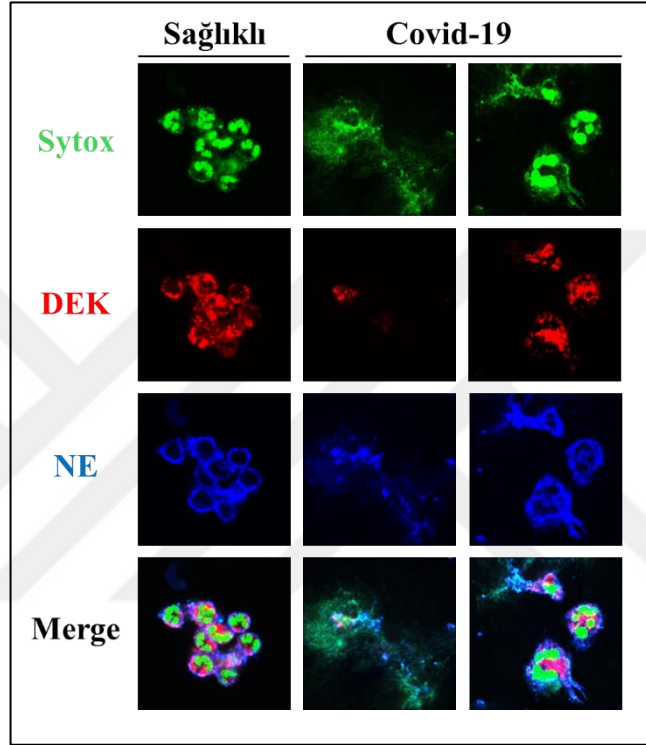
değerlendirilmiştir (Şekil 7.14). İncelemeler sonucunda sağlıklı birey serumları ile uyarılan nötrofillerin hücre bütünlüklerini koruduğu buna karşın COVID-19 serumu muamelesinin hücre dışı DNA ve nötrofil elastaz miktarını arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca rDEK ve rIL-8 uyarılan nötrofillerde NET oluşumunun baskılanmasına yeterli olan 200 nM Reparixin konsantrasyonu COVID-19 serumları ile uyarılan nötrofillerde yeterli olmamıştır (Şekil 7.14).



Şekil 7.14: Sağlıklı birey ve COVID-19 hastalarından alınan serumların Reparixin varlığı ve yokluğunda NETosis oluşturma kapasitelerinin immünofloresan boyama ile incelenmesi. Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 15 dakika boyunca 200 nM Reparixin ile inkübe edildikten sonra 2 saat boyunca finalde 1:5 (v/v) oranında sağlıklı ve COVID-19 birey serumlarıyla ya da 100 ng/ml rIL-8 ile uyarıldı. Önce Sytox green (yeşil) ile hücre dışı DNA ve hücrelerin fiksasyonunun ardından tavşan- anti-DEK (kırmızı) ve fare-anti-nötrofil elastaz (NE, mavi) ile boyanmıştır. Immünofloresan örnekleri 200X büyütme ile konfokal mikroskopta görüntülenmiştir.

DEK proteinin lokasyonu ayrıca konfokal mikroskobunda 630X büyütme ile incelendi. Literatür bilgilerine ve daha önce yapılan çalışmalarımıza göre DEK proteininin DNA'ya bağlanma kapasitesi olduğu bilinmektedir. Bu özelliği doğrultusunda DEK proteininin NET oluşumu sırasında DNA'ya bağlı olarak nötrofillerden atılması beklenmektedir. Buna rağmen hem sağlıklı birey hem de

COVID-19 hasta serumları ile uyarılan nötrofillerde DEK proteininin DNA ile birlikte bulunmadığı görülmüştür. Yapılan görüntülemelerde DEK proteininin nötrofil elastaz ile benzer konumlandığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak COVID-19 ile uyarılan NETosis sonucunda da nötrofil elastaz ve DNA ile birlikte hücre dışına atılmayan DEK proteini büyük oranda nötrofil içerisinde kalmış, hücre dışarısında eser miktarda tespit edilmiştir (Şekil 7.15).



Şekil 7.15: Sağlıklı birey ve COVID-19 hastalarından alınan serumlar ile uyarılan nötrofillerde DEK proteininin lokalizasyonu. Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 2 saat boyunca finalde 1:5 (v/v) oranında sağlıklı ve COVID-19 birey serumlarıyla uyarıldı. Önce Sytox green (yeşil) ile hücre dışı DNA ve hücrelerin fiksasyonunun ardından tavşan-anti-DEK (kırmızı) ve fare-anti-nötrofil elastaz (NE, mavi) ile boyanmıştır. İmmüno Floresan örnekleri 630X büyütme ile konfokal mikroskopta görüntülenmiştir.

7.7. COVID-19 Serumları ile Uyarılan NETosis'in Anti-DEK ve Anti-IL-8 Antikorları ve Reparixin ile Baskılanması

rDEK'in CXC1/2 reseptörleri aracılığıyla NET oluşumunu tetikleyebilir, COVID-19 hasta serumlarında DEK konsantrasyonunun değişmesi ve NETosis belirteçleri ve test edilen sitokinler ile korelasyonu, DEK proteininin COVID-19 ilişkili

NETosis’de önemli rolleri olabileceğine dair kanıtlar sunmaktadır. Bu veriler göz önüne alındığında DEK proteininin COVID-19 hastalarında CXCR1/2 reseptörleri aracılığıyla NET oluşumunu tetikleyebileceği ve anti-DEK antikoları ve CXCR1/2 inhibitörü Reparixin kullanılarak COVID-19 serumları ile uyarılan nötrofillerde NET oluşumunun baskılanabileceği hipotezini ele aldık. Bunun için anti-DEK antikoları ve Reparixin ile ön inkübasyona bırakılan sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller COVID-19 serumları ile uyarıldı. CXCR1/2’nin Reparixin ile inhibisyonu IL-8 ile ilişkili NET oluşumunu da azaltması beklendiği için COVID-19 serum örnekleri DEK ve IL-8 konsantrasyonlarına göre 3 farklı gruba ayrıldı: DEK yüksek-IL-8 yüksek, DEK yüksek-IL-8 düşük ve DEK düşük-IL-8 düşük (**Tablo 7.6**). Ayrıca IL-8 ilişkili NET oluşumunun inhibe edildiğini göstermek için anti-IL-8 antikorları da deneylerde kullanıldı.

Tablo 7.6: NETosis için test edilen sağlıklı birey ve COVID-19 hastası bireylere ait serumların ELISA değerleri. (KF: Konvalesan faz, AF: Akut Faz, t.e.: tespit edilemedi)

Grup	Örnek	DEK (ng/ml)	IL-8 (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)	IL-1 β (ng/ml)	MPO (pg/ml)	Cit-H3 (pg/ml)
DEK Yüksek - IL-8 Yüksek (COVID-19)	KF 1	1297	2606.792	750.79	650.325	14959.04	17.60535
	KF 2	1610	3119.752	1036.57	1601.27	25840.24	12.25895
	KF 3	1596	3111.64	1134.02	1616.385	17197.76	4.49936
	KF 4	1633	2628.376	723.56	348.5555	40413.12	28.9707
	KF 5	1459	2816.528	637.819	t.e.	t.e.	t.e.
DEK Yüksek - IL-8 Düşük (COVID-19)	KF 6	1905	31.05672	0	75.6515	31709.76	25.2099
	AF 1	1393	110.8304	31.5899	44.4808	17022.64	0
	AF 2	1294	65.24976	t.e.	27.1709	27773.36	15.6637
	AF 3	1208	108.2256	95.9132	29.7685	34795.12	8.35485
	AF 4	1156	23.64288	4.97047	31.2923	21321.52	18.2433
DEK Düşük - IL-8 Yüksek (COVID-19)	KF 7	780	3115.168	846.138	3367.705	42009.28	38.457
	KF 8	581	3117.8	865.372	319.516	31416.48	31.44635
	KF 9	657	2797.32	643.04	t.e.	t.e.	t.e.
	KF 10	592	2845.192	444.435	t.e.	t.e.	t.e.
	KF 11	685	2749.504	193.546	t.e.	t.e.	t.e.
Sağlıklı (Kontrol)	S 1	1093	174.5056	5.17473	52.142	21529.12	12.5544
	S 2	1344	12.68496	0	52.338	15758.64	7.87825
	S 3	t.e.	60.70472	0.003673	29.09425	21479.52	5.7961
	S 4	828	35.63936	0.057	77.219	23253.36	8.913

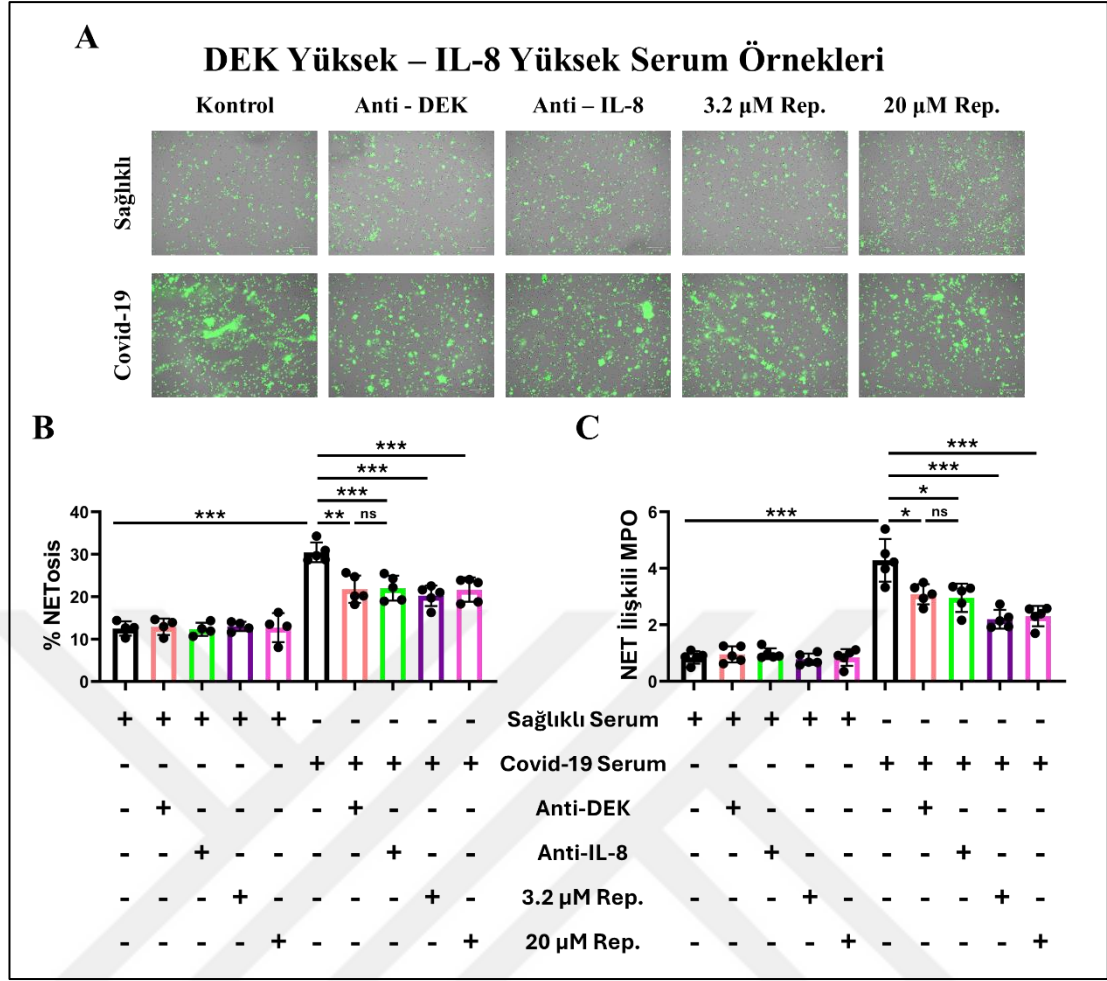
7.7.1. DEK Yüksek- IL-8 Yüksek COVID-19 Serum Örnekleri ile Tetiklenen NETosis

COVID-19 serumları ile uyarılan NETosis’de DEK proteininin rolünü incelemek için ilk olarak DEK (1297-1610 ng/ml) ve IL-8 (2606-3119 ng/ml) konsantrasyonu test edilen diğer serum örneklerine göre daha yüksek olan örnekler seçildi. Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller önce anti-DEK ve anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile ardından seçilen serum örnekleri ile muamele edildi. Ardından NET oluşumu hem

Sytox green boyaması ile morfolojik olarak hem NET ilişkili MPO yöntemi ile analiz edildi (**Şekil 7.16**).

Sytox green ile gerçekleştirilen morfolojik analizlere göre DEK ve IL-8 yüksek serumlar ile uyarılan nötrofillerde NETosis sağlıklı seruma göre istatistiksel olarak anlamlı 2.43 kat artış göstermiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları ile muamele edildiğinde sırasıyla %28 ve %28.7 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. Anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. 3.2 μ M ve 20 μ M Reparixin ile muamelede benzer şekilde NET oluşumunu sırasıyla %33.6 ve %21,7 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.16 A, B**).

Sytox green analizi sonuçları NET ilişki MPO analizi ile doğrulanmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre DEK ve IL-8 yüksek yüksek serumlar ile uyarılan nötrofillerde NET ilişki MPO, sağlıklı serumda istatistiksel olarak anlamlı 5.06 kat artış tespit edilmiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları ile muamele edildiğinde sırasıyla %28.1 ve %31 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. Anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. 3.2 μ M ve 20 μ M Reparixin ile muamelede benzer şekilde NET oluşumunu %48.7 ve %47.7 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.16 C**).



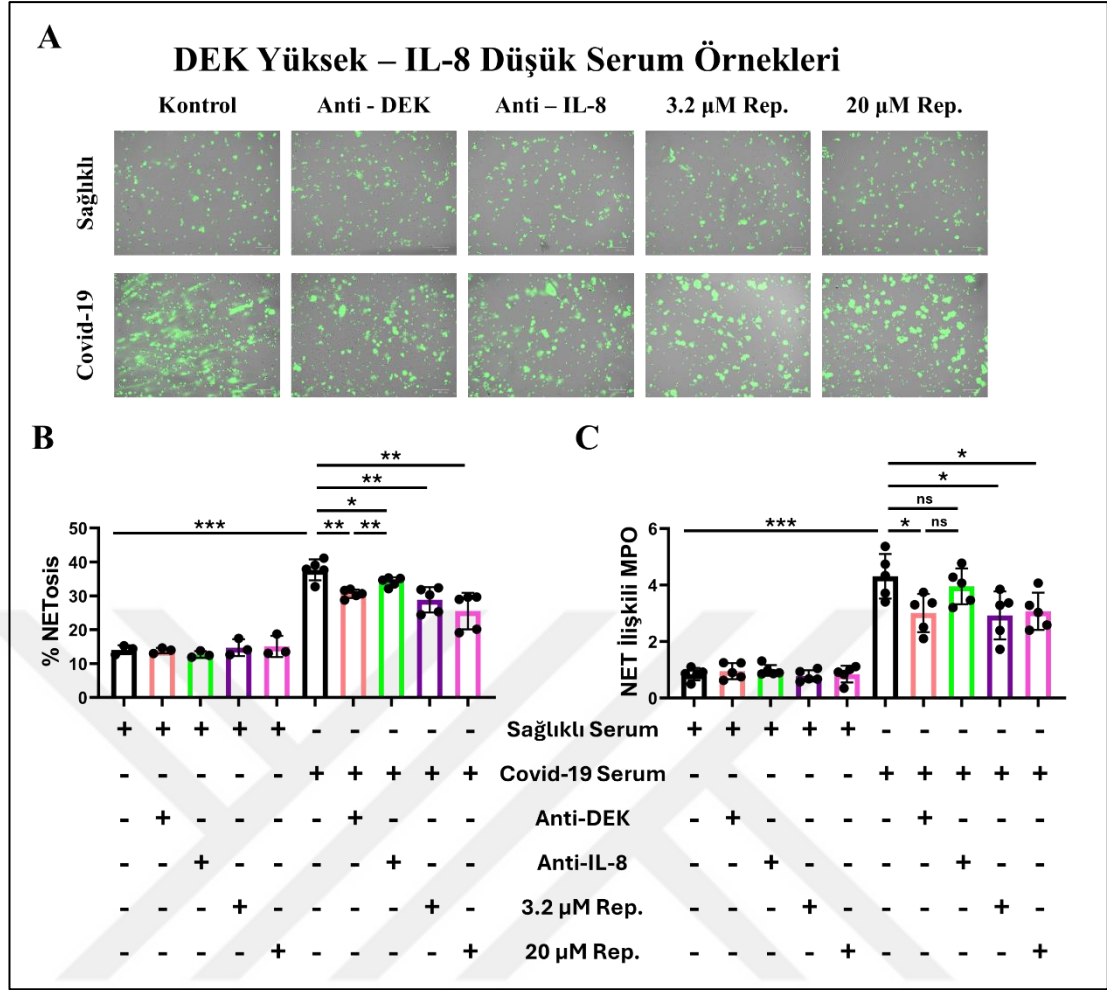
Şekil 7.16: DEK ve IL-8 konsantrasyonu yüksek serumlar ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorumları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması (A-C) sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 120 dakika boyunca 2,5 μ g/ml anti-DEK, 2,5 μ g/ml anti-IL-8 ya da 3,2–20 μ M Reparixin ile inkübe edildikten sonra 120 dakika boyunca 1:5 oranında sağlıklı (n=4-5) ve COVID-19 (n=5) hastası bireylerden elde edilen serumlar ile uyarılmıştır. (A, B) Ardından nötrofiller Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan ZOE floresan mikroskopu ile hem parlak alan hem de floresan olarak 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. (C) Paralel olarak gerçekleştirilen NET ilişkili MPO seviyesi analizi. Her örnek o deneydeki kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

7.7.2. DEK Yüksek- IL-8 Düşük COVID-19 Serum Örnekleri ile Tetiklenen NETosis

COVID-19 serumları ile uyarılan NETosis’de DEK proteininin rolü daha sonra test edilen diğer serum örneklerine göre DEK (1156-1905ng/ml) konsantrasyonu daha yüksek ve IL-8 (24-111 ng/ml) konsantrasyonu daha düşük olan örneklerde incelendi. Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller önce anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları ve Reparixin ile ardından seçilen serum örnekleri ile muamele edildi. Ardından NET oluşumu hem Sytox green boyaması ile morfolojik olarak hem NET ilişkili MPO yöntemi ile analiz edildi (**Şekil 7.17**).

Sytox green ile gerçekleştirilen morfolojik analizlere göre DEK yüksek ve IL-düşük serumlar ile uyarılan nötrofillerde NETosis, sağlıklı seruma göre istatistiksel olarak anlamlı 2.67 kat artış göstermiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları ile muamele edildiğinde sırasıyla %18.7 ve %9.4 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. Buna rağmen anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. 3.2 µM ve 20 µM Reparixin ile muamelede benzer şekilde NET oluşumunu sırasıyla %23.4 ve %32.3 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.17 A, B**).

Sytox green analizi sonuçları NET ilişki MPO analizi ile doğrulanmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre DEK yüksek ve IL-8 düşük serumlar ile uyarılan nötrofillerde NET ilişki MPO, sağlıklı seruma göre istatistiksel olarak anlamlı 5.08 kat artış tespit edilmiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-DEK antikoru ile muamele edildiğinde %30.3 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmasına rağmen anti-IL-8 antikoru ile muamele NETosis miktarını %8.23 oranında azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları arasındaki fark da anlamlı değildir. 3.2 µM ve 20 µM Reparixin ile muamelede ise NET oluşumunu %32.3 ve %28 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.17 C**).



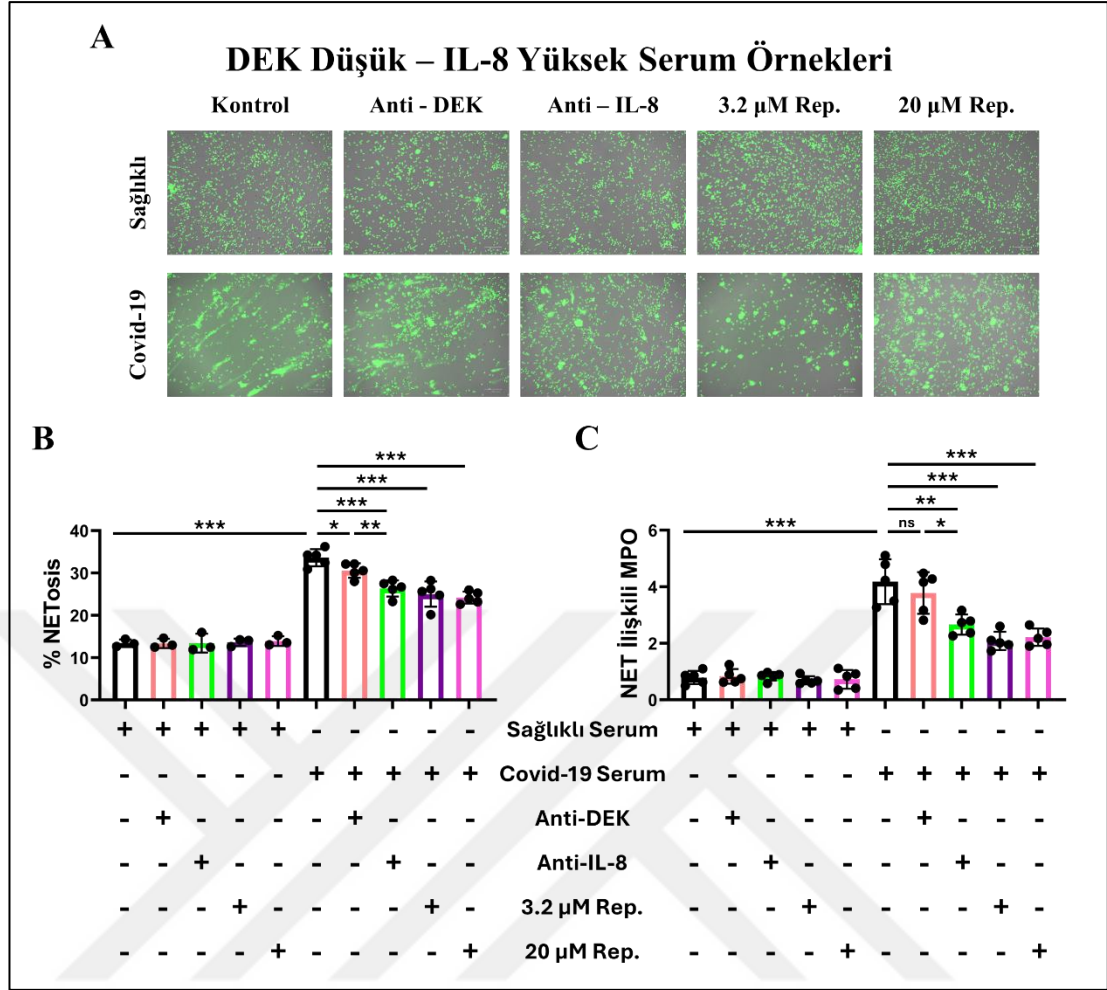
Şekil 7.17: Yüksek DEK ve düşük IL-8 konsantrasyonlu serumlar ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması (A-C) sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 120 dakika boyunca 2,5 μ g/ml anti-DEK, 2,5 μ g/ml anti-IL-8 ya da 3,2–20 μ M Reparixin ile inkübe edildikten sonra 120 dakika boyunca 1:5 oranında sağlıklı (n=3-5) ve COVID-19 (n=5) hastası bireylerden elde edilen serumlar ile uyarılmıştır. (A, B) Ardından nötrofiller Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan ZOE floresan mikroskopu ile hem parlak alan hem de floresan olarak 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. (C) Paralel olarak gerçekleştirilen NET ilişkili MPO seviyesi analizi. Her örnek o deneydeki kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

7.7.3. DEK Düşük- IL-8 Yüksek COVID-19 Serum Örnekleri ile Tetiklenen NETosis

COVID-19 serumları ile uyarılan NETosis’de DEK proteininin rolü daha sonra test edilen diğer serum örneklerine göre DEK (581–780 ng/ml) konsantrasyonu daha düşük ve IL-8 (2749-33117 ng/ml) konsantrasyonu daha düşük olan örneklerde incelendi. Sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller önce anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları ve Reparixin ile ardından seçilen serum örnekleri ile muamele edildi. Ardından NET oluşumu hem Sytox green boyaması ile morfolojik olarak hem NET ilişkili MPO yöntemi ile analiz edildi (**Şekil 7.18**).

Sytox green ile gerçekleştirilen morfolojik analizlere göre DEK düşük ve IL-8 yüksek serumlar ile uyarılan nötrofillerde NETosis, sağlıklı seruma göre istatistiksel olarak anlamlı 2.5 kat artış göstermiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları ile muamele edildiğinde sırasıyla %9.01 ve %21.6 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. Ayrıca anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları arasında da anlamlı bir fark tespit edilmiştir. 3.2 µM ve 20 µM Reparixin ile muamelede benzer şekilde NET oluşumunu sırasıyla %25.6 ve %28 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.18 A, B**).

Sytox green analizi sonuçları NET ilişki MPO analizi ile doğrulanmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre DEK düşük ve IL-8 yüksek serumlar ile uyarılan nötrofillerde NET ilişki MPO, sağlıklı seruma göre istatistiksel olarak anlamlı 5.3 kat artış tespit edilmiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-IL-8 antikoru ile muamele edildiğinde %36.2 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmasına rağmen anti-DEK antikoru ile muamele NETosis miktarını %9.54 oranında azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca anti-DEK ve anti-IL-8 antikoları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır. 3.2 µM ve 20 µM Reparixin ile muamelede ise NET oluşumunu %54.2 ve %47 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.18 C**).

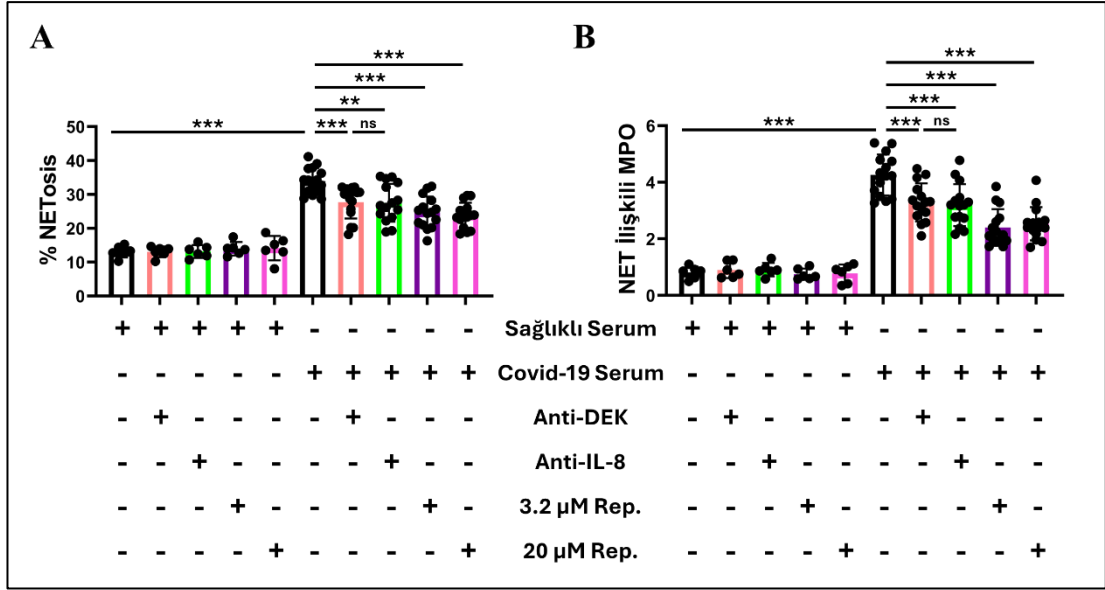


Şekil 7.18: Düşük DEK ve yüksek IL-8 konsantrasyonlu serumlar ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması (A-C) sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 120 dakika boyunca 2,5 μ g/ml anti-DEK, 2,5 μ g/ml anti-IL-8 ya da 3,2–20 μ M Reparixin ile inkübe edildikten sonra 120 dakika boyunca 1:5 oranında sağlıklı (n=3-5) ve COVID-19 (n=5) hastası bireylerden elde edilen serumlar ile uyarılmıştır. (A, B) Ardından nötrofiller Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan ZOE floresan mikroskopu ile hem parlak alan hem de floresan olarak 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. (C) Paralel olarak gerçekleştirilen NET ilişkili MPO seviyesi analizi. Her örnek o deneydeki kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Grafikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Tüm COVID-19 serumlarına ait sonuçlar birlikte analiz edildiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 7.19). Sytox green ile gerçekleştirilen morfolojik analizlere göre COVID-19 hastalarına ait serumlar ile uyarılan nötrofillerde NETosis sağlıklı

serumlara göre istatistiksel olarak anlamlı 2.59 kat artış göstermiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-DEK ve anti-IL-8 antikorları ile muamele edildiğinde sırasıyla %18 ve %18.9 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. Anti-DEK ve anti-IL-8 antikorları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. 3.2 μ M ve 20 μ M Reparixin ile muamelede benzer şekilde NET oluşumunu sırasıyla %27.2 ve %29.9 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.19 A**).

Sytox green analizi sonuçları NET ilişki MPO analizi ile doğrulanmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre COVID-19 hastalarına ait serumlar ile uyarılan nötrofillerde NET ilişki MPO, sağlıklı serumlara göre istatistiksel olarak anlamlı 5.25 kat artış tespit edilmiştir. Ayrıca COVID-19 ile uyarılan serumlardaki NETosis miktarı anti-DEK ve anti-IL-8 antikorları ile muamele edildiğinde sırasıyla %22.8 ve %25.1 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azalmıştır. Anti-DEK ve anti-IL-8 antikorları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. 3.2 μ M ve 20 μ M Reparixin ile muamelede benzer şekilde NET oluşumunu %43.6 ve %40.6 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (**Şekil 7.19 B**).



Şekil 7.19: COVID-19 serumları ile uyarılan nötrofillerde anti-DEK, anti-IL-8 antikorları ve Reparixin ile NET oluşumunun baskılanması (A-C) sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofiller 120 dakika boyunca 2,5 µg/ml anti-DEK, 2,5 µg/ml anti-IL-8 ya da 3,2–20 µM Reparixin ile inkübe edildikten sonra 120 dakika boyunca 1:5 oranında sağlıklı (n=6) ve COVID-19 (n=15) hastası bireylerden elde edilen serumlar ile uyarılmıştır. (A, B) Ardından nötrofiller Sytox green (yeşil) ile boyanmıştır. Her örnek 5 bağımsız alandan ZOE floresan mikroskopu ile hem parlak alan hem de floresan olarak 200X büyütme ile görüntülenmiştir. (A) Test edilen tüm koşullar için temsili mikroskop görüntüleri. (B) Görüntülenen alanların DANA I analizi ile NET oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi. (C) Paralel olarak gerçekleştirilen NET ilişkili MPO seviyesi analizi. Her örnek o deneydeki kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Grafikler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Graphpad Prism 8.0.2 programı kullanılarak unpaired two-tailed t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. (**p<0.01, ***p<0.001)

8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

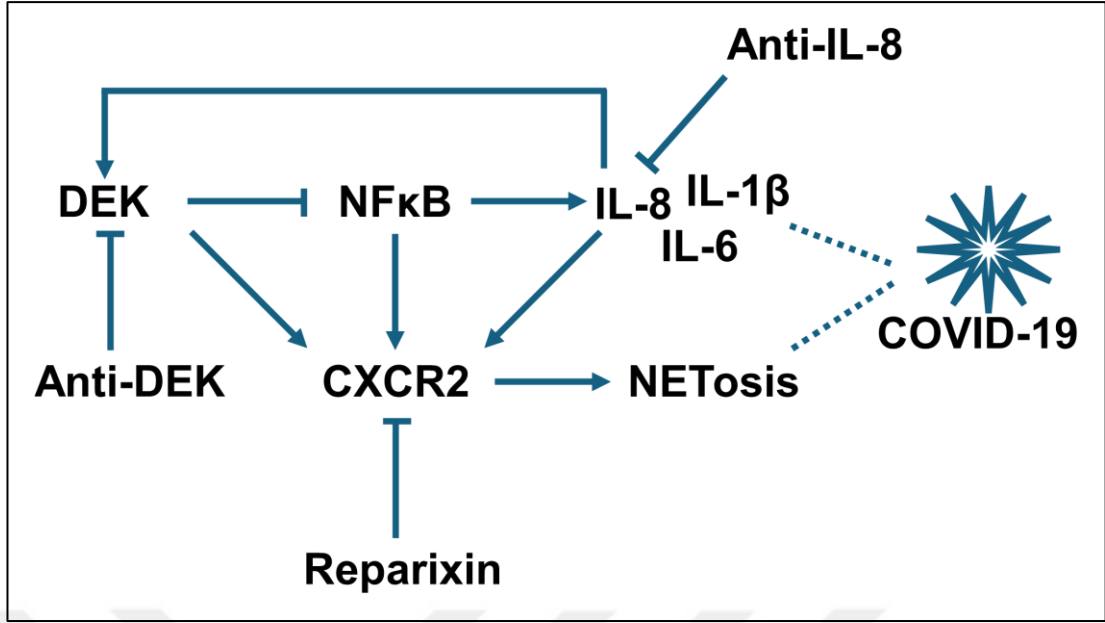
DEK proteini 375 amino asit uzunluğunda kromatine bağlanma kapasitesi olan bir çekirdek proteinidir [Carro vd., 2006]. Hücrede transkripsiyon, DNA tamiri ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi olaylarda rol oynar [Broxmeyer vd., 2013], [Sanden and Gullberg, 2015]. Yoğunlukla çekirdekte bulunmasına rağmen, post translasyonel modifikasyonlar sonucu DNA'ya olan bağlanma afinitesini kaybederek hücreden salgılanabilir [Saha vd., 2013]. Salgılanan DEK'in, nötrofiller, T-lenfositleri ve NK hücreleri için kemo-çekici özelliği vardır [Mor-Vaknin vd., 2006], [Mor-Vaknin vd., 2011].

DEK'in salgılanması otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir ve DEK oto-antikorlarına JIA hastalarının eklem sıvılarında rastlanmıştır [Mor-Vaknin vd., 2006], [Mor-Vaknin vd., 2011], [Mor-Vaknin vd., 2017]. DEK geni silinmiş JIA fare modelinden izole edilen nötrofillerin PMA ve LPS ile uyarıldığında NETosis oluşturma kapasitelerini kaybettikleri görülmüş fakat rDEK ile muamele sonucu tekrar NETosis olduğu bildirilmiştir [Mor-Vaknin vd., 2017]. Bu durum DEK proteininin NETosis'de rol oynadığını kanıtlar niteliktedir fakat rDEK' in tek başına NETosis'i uyarmaya yeterli olup olmadığı bilinmemektedir. Bu soruya cevap aradığımız bu tez çalışmasında, rDEK proteininin sağlıklı bireylerden izole edilen nötrofillerde NET oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğunu, bu durumun anti-DEK antikoru varlığında baskılandığını gösterdik (Şekil 7.3). DEK'i hedefleyen aptamerler ile muamale edildiğinde nötrofillerin NETosis kapasitesini kaybettiği bilindiğinden, anti-DEK antikorlarında da benzer etkiyi görmek şaşırtıcı değildir [Mor-Vaknin vd., 2017].

DEK proteininin kromatine bağlanma özelliğinden dolayı NETosis üzerindeki etkisinin kromatin düzenlemeleri ile ilgili olduğu düşünülmekteydi [Mor-Vaknin vd., 2017]. Yaptığımız immünofloresan çalışmaları ile DEK proteininin insan nötrofil hücrelerinde çekirdekte veya DNA'ya bağlı şekilde NET yapılarında bulunmadığını ya da eser miktarda bulunduğunu gösterdik. Buna karşılık DEK'in hücre içerisinde nötrofil elastaz ile benzer lokalizasyon gösterdiğini ve granüllerde bulunduğunu tespit ettik. Salgılanan DEK'in CXCR2 aracılığıyla hematopoetik kök hücre proliferasyonunu düzenlediği bilinmekteydi fakat daha önce nötrofillerde benzer bir etkileşim bildirilmemişti [Capitano vd., 2019], [Wilcher vd., 2023]. Bu tez

çalışmasında rDEK aracılığıyla uyarılan nötrofillerde meydana gelen NETosis'in anti-DEK antikorunun yanı sıra CXCR1/2 inhibitörü olan reparixin ile de baskılandığını tespit ettik. Bu veriler, DEK'in CXCR2'ye bağlanması NET oluşumunda rolü olduğunu düşündürmektedir. Sonuçlarımız ayrıca DEK-CXCR2 etkileşiminin farklı hematopoetik hücre türlerinde farklı sonuçlara yol açtığını; bu etkileşimin, hematopoietik kök hücre sayısının artışı ve hematopoietik progenitör hücre sayısının azalmasına ilave olarak [Capitano vd., 2019], primer insan nötrofillerinde NETosis'in indüklenmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir.

DEK proteininin NFκB sinyalini negatif yönde düzenlediği ve dolayısıyla DEK miktarındaki azalmanın IL-1β, IL-6, IL-8 ve CXCR2 gibi NFκB hedef proteinleri ifadesini arttırdığı bilinmektedir (Şekil 8.1) [Sammons vd., 2006], [Kang vd., 2007], [Hiscott vd.,1993], [Son vd., 2008], [Maxwell vd., 2007]. NET oluşumundaki rolüne rağmen DEK'in COVID-19 ile gelişen NETosis ve sitokin fırtınasında rolü olup olmadığı bilinmemektedir. Sağlıklı ve COVID-19 hastası bireylerden topladığımız serumlar ile yaptığımız ELISA çalışmalarında SARS-CoV-2 enfeksiyonunun serumdaki DEK miktarında azalmayla ilişkili olduğunu tespit ettik. Bu azalış özellikle hastalığın başlangıcında (akut evre) daha belirgindi. Buna ek olarak DEK proteini ve NFκB ilişkili sitokinler arasında pozitif yönlü korelasyonlar olduğunu gösterdik (Şekil 8.1). Buna rağmen çalışmalarımızda serumlarını kullandığımız hastaların COVID-19 hastalığının şiddeti açısından takip edemediğimiz için DEK ifadesinin hastalığın şiddeti ile bağlantısına dair yorum yapamamaktayız.



Şekil 8.1: DEK proteini ve etkileşimlerinin COVID-19 ile bağlantıları.

NETosis ve artan sitokin miktarı, COVID-19 hastalığının kötü seyri ve şiddeti ile bağlantılıdır [Rong vd., 2024]. Bu doğrultuda NET oluşumunu baskılayıcı ilaçların klinik denemeleri halen devam etmektedir. IL-1 β , IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin doğrudan inhibisyonu veya CXCR1/2 reseptörlerinin reparixin gibi ilaçlar ile bloke edilmesi gibi tedavi yöntemleri umut verici sonuçlar sunmaktadır [Morgulchik vd., 2021], [Landoni vd., 2022], [Kaiser vd., 2021]. Yaptığımız morfolojik ve enzimatik analizler sonucunda, COVID-19 hastalarından elde edilen serumlar ile uyarılan NET oluşumunun anti-DEK ve anti-IL-8 antikorları veya reparixin ile inhibe edildiğini gösterdik (Şekil 8.1). Bu kimyasallarla sağlanan NETosis inhibisyonunun, uyarıcı olarak kullanılan serumlardaki DEK veya IL-8 konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğunu da tespit ettik. Buna göre, DEK konsantrasyonunun daha yüksek fakat IL-8 konsantrasyonunun daha düşük olduğu serumlarda anti-DEK ile inhibisyon daha güçlü olurken, tam tersi olduğu durumlarda anti-IL-8 antikoruna daha etkili inhibisyon sağlandı. Reparixin uygulaması ise tüm koşullarda antikorlara göre daha etkin NETosis inhibisyonuna sebep oldu. Bu durum COVID-19' un neden olduğu NETosis'de DEK ve IL-8 dışında başka faktörlerin de CXCR1/2 reseptörleri aracılığıyla süreçte etki gösterebileceğini; kuvvetli bir inhibisyon sağlanabilmesi için NETosisi tetikleyen faktörlerin birlikte hedeflenmesinin daha etkin olacağını düşündürmektedir.

Özetle, sonuçlarımız DEK'in COVID-19 kaynaklı NETosis'te rol oynadığını ilk olarak ortaya koymaktadır ve CXCR1/CXCR2 reseptörlerinin bloke edilmesinin hastalık için potansiyel bir terapötik yaklaşım olabileceğini desteklemektedir (**Şekil 8.1**).

Bu tez çalışması TÜBİTAK 120S979 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.



KAYNAKLAR

Adams, B. S., Cha, H. C., Cleary, J., Haiying, T., Wang, H., Sitwala, K., & Markovitz, D. M. (2003). DEK binding to class II MHC Y-box sequences is gene- and allele-specific. *Arthritis Research & Therapy*, 5(4), R226–R233.

Adrover, J. M., Aroca-Crevillén, A., Crainiciuc, G., Ostos, F., Rojas-Vega, Y., Rubio-Ponce, A., Cilloniz, C., Bonzón-Kulichenko, E., Calvo, E., Rico, D., Moro, M. A., Weber, C., Lizasoain, I., Torres, A., Ruiz-Cabello, J., Vázquez, J., & Hidalgo, A. (2020). Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nature Immunology*, 21(2), 135–144.

Adrover, J. M., Del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M. I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L. A., Huerga-Encabo, H., Silvestre-Roig, C., Rossaint, J., Cossío, I., Lechuga-Vieco, A. V., García-Prieto, J., Gómez-Parrizas, M., Quintana, J. A., Ballesteros, I., Martín-Salamanca, S., Aroca-Crevillén, A., Chong, S. Z., Evrard, M., Balabanian, K., Hidalgo, A. (2019). A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity*, 50(2), 390–402.e10.

Ageberg, M., Gullberg, U., & Lindmark, A. (2006). The involvement of cellular proliferation status in the expression of the human proto-oncogene DEK. *Haematologica*, 91(2), 268–269.

Albright, R. A., Stabach, P., Cao, W., Kavanagh, D., Mullen, I., Braddock, A. A., Covo, M. S., Tehan, M., Yang, G., Cheng, Z., Bouchard, K., Yu, Z. X., Thorn, S., Wang, X., Folta-Stogniew, E. J., Negrete, A., Sinusas, A. J., Shiloach, J., Zubal, G., Madri, J. A., Braddock, D. T. (2015). ENPP1-Fc prevents mortality and vascular calcifications in rodent model of generalized arterial calcification of infancy. *Nature Communications*, 6, 10006.

Alexiadis, V., Waldmann, T., Andersen, J., Mann, M., Knippers, R., & Gruss, C. (2000). The protein encoded by the proto-oncogene DEK changes the topology of chromatin and reduces the efficiency of DNA replication in a chromatin-specific manner. *Genes & Development*, 14(11), 1308–1312.

Aravind, L., & Koonin, E. V. (2000). SAP- a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(3), 112–114.

Berger, M., Hsieh, C. Y., Bakele, M., Marcos, V., Rieber, N., Kormann, M., Mays, L., Hofer, L., Neth, O., Vitkov, L., Krautgartner, W. D., von Schweinitz, D., Kappler, R., Hector, A., Weber, A., & Hartl, D. (2012). Neutrophils express distinct RNA receptors in a non-canonical way. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19409–19417.

Böhm, F., Kappes, F., Scholten, I., Richter, N., Matsuo, H., Knippers, R., & Waldmann, T. (2005). The SAF-box domain of chromatin protein DEK. *Nucleic Acids Research*, 33(3), 1101–1110.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535.

Broxmeyer, H. E., Kappes, F., Mor-Vaknin, N., Legendre, M., Kinzfohl, J., Cooper, S., Hangoc, G., & Markovitz, D. M. (2012). DEK regulates hematopoietic stem engraftment and progenitor cell proliferation. *Stem Cells and Development*, 21(9), 1449–1454.

Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 119(24), 5640–5649.

Capitano, M. L., & Broxmeyer, H. E. (2017). A role for intracellular and extracellular DEK in regulating hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 24(4), 300–306.

Capitano, M. L., Mor-Vaknin, N., Saha, A. K., Cooper, S., Legendre, M., Guo, H., Contreras-Galindo, R., Kappes, F., Sartor, M. A., Lee, C. T., Huang, X., Markovitz, D. M., & Broxmeyer, H. E. (2019). Secreted nuclear protein DEK regulates hematopoiesis through CXCR2 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(6), 2555–2570.

Capitano, M. L., Sammour, Y., Ropa, J., Legendre, M., Mor-Vaknin, N., & Markovitz, D. M. (2022). DEK, a nuclear protein, is chemotactic for hematopoietic stem/progenitor cells acting through CXCR2 and Gai signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 112(3), 449–456.

Carro, M. S., Spiga, F. M., Quarto, M., Di Ninni, V., Volorio, S., Alcalay, M., Muller, H. (2006). DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types. *Cell Cycle*, 5, 1202–1207.

Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423.

da Silva, S. J. R., do Nascimento, J. C. F., Germano Mendes, R. P., Guarines, K. M., Targino Alves da Silva, C., da Silva, P. G., de Magalhães, J. J. F., Vigar, J. R. J., Silva-Júnior, A., Kohl, A., Pardee, K., & Pena, L. (2022). Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. *ACS Infectious Diseases*, 8(9), 1758–1814.

Dąbrowska, D., Jabłońska, E., Garley, M., Ratajczak-Wrona, W., & Iwaniuk, A. (2016). New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scandinavian Journal of Immunology*, 84(6), 317–322.

Dahlgren, C., & Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, 232(1-2), 3–14.

de Bont, C. M., Boelens, W. C., & Pruijn, G. J. M. (2019). NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(1), 19–27.

de Buhr, N., & von Köckritz-Blickwede, M. (2016). How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *Journal of Immunology Research*, 2016, 4604713.

- de Oliveira, S., Rosowski, E. E., & Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 378–391.
- Devany, M., Kappes, F., Chen, K. M., Markovitz, D. M., & Matsuo, H. (2008). Solution NMR structure of the N-terminal domain of the human DEK protein. *Protein Science*, 17(2), 205–215.
- Devine, S. M., Vij, R., Rettig, M., Todt, L., McGlauchlen, K., Fisher, N., Devine, H., Link, D. C., Calandra, G., Bridger, G., Westervelt, P., & Dippersio, J. F. (2008). Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood*, 112(4), 990–998.
- Dong, X., Michelis, M. A., Wang, J., Bose, R., DeLange, T., & Reeves, W. H. (1998). Autoantibodies to DEK oncoprotein in a patient with systemic lupus erythematosus and sarcoidosis. *Arthritis and Rheumatism*, 41(8), 1505–1510.
- Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., & Rossi, A. G. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 216–227.
- Fu, G. K., Grosveld, G., & Markovitz, D. M. (1997). DEK, an autoantigen involved in a chromosomal translocation in acute myelogenous leukemia, binds to the HIV-2 enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1811–1815.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241.
- Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*, 17(3), 638–650.
- Gajiwala, K. S., & Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(1), 110–116.
- Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R. L., Barrat, F. J., Banchereau, J., & Pascual, V. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, 3(73), 73ra20.
- Giaglis, S., Stoikou, M., Sur Chowdhury, C., Schaefer, G., Grimolizzi, F., Rossi, S. W., Hoesli, I. M., Lapaire, O., Hasler, P., & Hahn, S. (2016). Multimodal Regulation of NET Formation in Pregnancy: Progesterone Antagonizes the Pro-NETotic Effect of Estrogen and G-CSF. *Frontiers in Immunology*, 7, 565.
- Gierlikowska, B., Stachura, A., Gierlikowski, W., & Demkow, U. (2021). Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils-The

Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 666732.

Hallett, M. B., & Lloyds, D. (1995). Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunology Today*, 16(6), 264–268.

Heifets, L. (1982). Centennial of Metchnikoff's discovery. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 31(5), 381–391.

Hiscott, J., Marois, J., Garoufalos, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., & Bensi, G. (1993). Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), 6231–6240.

Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R., & Grosveld, G. (2002). Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 16), 3319–3330.

Hollenstein, U., Homoncik, M., Stohlawetz, P. J., Marsik, C., Sieder, A., Eichler, H. G., & Jilka, B. (2000). Endotoxin down-modulates granulocyte colony-stimulating factor receptor (CD114) on human neutrophils. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(1), 343–346.

Hong, C. W. (2017). Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Network*, 17(5), 298–306.

Hoppenbrouwers, T., Autar, A. S. A., Sultan, A. R., Abraham, T. E., van Cappellen, W. A., Houtsmuller, A. B., van Wamel, W. J. B., van Beusekom, H. M. M., van Neck, J. W., & de Maat, M. P. M. (2017). In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PloS One*, 12(5), e0176472.

Ibrahim, M. M., Fjære, E., Lock, E. J., Naville, D., Amlund, H., Meugnier, E., Le Magueresse Battistoni, B., Frøyland, L., Madsen, L., Jessen, N., Lund, S., Vidal, H., & Ruzzin, J. (2011). Chronic consumption of farmed salmon containing persistent organic pollutants causes insulin resistance and obesity in mice. *PloS One*, 6(9), e25170.

Ishida, K., Nakashima, T., Shibata, T., Hara, A., & Tomita, H. (2020). Role of the DEK oncogene in the development of squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*, 25(9), 1563–1569.

Ivanauskiene, K., Delbarre, E., McGhie, J. D., Küntziger, T., Wong, L. H., & Collas, P. (2014). The PML-associated protein DEK regulates the balance of H3.3 loading on chromatin and is important for telomere integrity. *Genome Research*, 24(10), 1584–1594.

Kaiser, R., Leunig, A., Pekayvaz, K., Popp, O., Joppich, M., Polewka, V., Escaig, R., Anjum, A., Hoffknecht, M. L., Gold, C., Brambs, S., Engel, A., Stockhausen, S., Knottenberg, V., Titova, A., Haji, M., Scherer, C., Muenchhoff, M., Hellmuth, J. C.,

Saar, K., Stark, K. (2021). Self-sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. *JCI Insight*, 6(18), e150862.

Kang, H. B., Kim, Y. E., Kwon, H. J., Sok, D. E., & Lee, Y. (2007). Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. *Stem Cells and Development*, 16(4), 615–623.

Kappes, F., Burger, K., Baack, M., Fackelmayer, F. O., & Gruss, C. (2001). Subcellular localization of the human proto-oncogene protein DEK. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26317–26323.

Kappes, F., Damoc, C., Knippers, R., Przybylski, M., Pinna, L. A., & Gruss, C. (2004). Phosphorylation by protein kinase CK2 changes the DNA binding properties of the human chromatin protein DEK. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 6011–6020.

Kappes, F., Fahrner, J., Khodadoust, M. S., Tabbert, A., Strasser, C., Mor-Vaknin, N., Moreno-Villanueva, M., Bürkle, A., Markovitz, D. M., & Ferrando-May, E. (2008). DEK is a poly(ADP-ribose) acceptor in apoptosis and mediates resistance to genotoxic stress. *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), 3245–3257.

Kappes, F., Scholten, I., Richter, N., Gruss, C., & Waldmann, T. (2004). Functional domains of the ubiquitous chromatin protein DEK. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 6000–6010.

Kavanaugh, G. M., Wise-Draper, T. M., Morreale, R. J., Morrison, M. A., Gole, B., Schwemberger, S., Tichy, E. D., Lu, L., Babcock, G. F., Wells, J. M., Drissi, R., Bissler, J. J., Stambrook, P. J., Andreassen, P. R., Wiesmüller, L., & Wells, S. I. (2011). The human DEK oncogene regulates DNA damage response signaling and repair. *Nucleic Acids Research*, 39(17), 7465–7476.

Khodadoust, M. S., Verhaegen, M., Kappes, F., Riveiro-Falkenbach, E., Cigudosa, J. C., Kim, D. S., Chinnaiyan, A. M., Markovitz, D. M., & Soengas, M. S. (2009). Melanoma proliferation and chemoresistance controlled by the DEK oncogene. *Cancer Research*, 69(16), 6405–6413.

Kim, D. W., Kim, J. Y., Choi, S., Rhee, S., Hahn, Y., & Seo, S. B. (2010). Transcriptional regulation of 1-cys peroxiredoxin by the proto-oncogene protein DEK. *Molecular Medicine Reports*, 3(5), 877–881.

Kim, T. H., Shin, S. W., Park, J. S., & Park, C. S. (2015). Genome wide identification and expression profile in epithelial cells exposed to TiO₂ particles. *Environmental Toxicology*, 30(3), 293–300.

Lacy, P. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, 2(3), 98–108.

Landoni, G., Piemonti, L., Monforte, A. D., Grossi, P., Zangrillo, A., Bucci, E., Allegretti, M., Goisis, G., Gavioli, E. M., Patel, N., De Pizzol, M., Pasedis, G., & Mantelli, F. (2022). A Multicenter Phase 2 Randomized Controlled Study on the Efficacy and Safety of Reparixin in the Treatment of Hospitalized Patients with COVID-19 Pneumonia. *Infectious Diseases and Therapy*, 11(4), 1559–1574.

- Lee, H., Whitfeld, P. L., & Mackay, C. R. (2008). Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. *Immunology and Cell Biology*, 86(2), 153–160.
- Lempp, F. A., Soriaga, L. B., Montiel-Ruiz, M., Benigni, F., Noack, J., Park, Y. J., Bianchi, S., Walls, A. C., Bowen, J. E., Zhou, J., Kaiser, H., Joshi, A., Agostini, M., Meury, M., Dellota, E., Jr, Jaconi, S., Camerini, E., Martinez-Picado, J., Vergara-Alert, J., Izquierdo-Useros, N., Corti, D. (2021). Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature*, 598(7880), 342–347.
- Li, T., Zhang, Z., Li, X., Dong, G., Zhang, M., Xu, Z., & Yang, J. (2020). Neutrophil Extracellular Traps: Signaling Properties and Disease Relevance. *Mediators of Inflammation*, 2020, 9254087.
- Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K. J., Basu, S., Zhan, Y. F., & Dunn, A. R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84(6), 1737–1746.
- Liu, B., Sun, Y., Zhang, Y., Xing, Y., & Suo, J. (2022). DEK modulates both expression and alternative splicing of cancer-related genes. *Oncology Reports*, 47(6), 111.
- Liu, K., Feng, T., Liu, J., Zhong, M., & Zhang, S. (2012). Silencing of the DEK gene induces apoptosis and senescence in CaSki cervical carcinoma cells via the up-regulation of NF- κ B p65. *Bioscience Reports*, 32(3), 323–332.
- Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F., Sahi, V., Figueroa, A., Guo, X. V., Cerutti, G., Bimela, J., Gorman, J., Zhou, T., Chen, Z., Yuen, K. Y., Kwong, P. D., Sodroski, J. G., Yin, M. T., Ho, D. D. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 584(7821), 450–456.
- Liu, Y. C., Kuo, R. L., & Shih, S. R. (2020). COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomedical Journal*, 43(4), 328–333.
- Lundqvist, H., Follin, P., Khalfan, L., & Dahlgren, C. (1996). Phorbol myristate acetate-induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(2), 270–279.
- Maxwell, P. J., Gallagher, R., Seaton, A., Wilson, C., Scullin, P., Pettigrew, J., Stratford, I. J., Williams, K. J., Johnston, P. G., & Waugh, D. J. (2007). HIF-1 and NF- κ B-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene*, 26(52), 7333–7345.
- Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., & Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*, 117(3), 953–959.

Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., & Papayannopoulos, V. (2014). A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports*, 8(3), 883–896.

Miralda, I., Uriarte, S. M., & McLeish, K. R. (2017). Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 217.

Moresco, E. M., LaVine, D., & Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Current Biology*, 21(13), R488–R493.

Morgulchik, N., Athanasopoulou, F., Chu, E., Lam, Y., & Kamaly, N. (2021). Potential therapeutic approaches for targeted inhibition of inflammatory cytokines following COVID-19 infection-induced cytokine storm. *Interface Focus*, 12(1), 20210006.

Mor-Vaknin, N., Kappes, F., Dick, A. E., Legendre, M., Damoc, C., Teitz-Tennenbaum, S., Kwok, R., Ferrando-May, E., Adams, B. S., & Markovitz, D. M. (2011). DEK in the synovium of patients with juvenile idiopathic arthritis: characterization of DEK antibodies and posttranslational modification of the DEK autoantigen. *Arthritis and Rheumatism*, 63(2), 556–567.

Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K., Faulkner, N., Legendre, M., Khodadoust, M. S., Kappes, F., Ruth, J. H., Koch, A., Glass, D., Petruzzelli, L., Adams, B. S., & Markovitz, D. M. (2006). The DEK nuclear autoantigen is a secreted chemotactic factor. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9484–9496.

Mor-Vaknin, N., Saha, A., Legendre, M., Carmona-Rivera, C., Amin, M. A., Rabquer, B. J., Gonzales-Hernandez, M. J., Jorns, J., Mohan, S., Yalavarthi, S., Pai, D. A., Angevine, K., Almburg, S. J., Knight, J. S., Adams, B. S., Koch, A. E., Fox, D. A., Engelke, D. R., Kaplan, M. J., Markovitz, D. M. (2017). DEK-targeting DNA aptamers as therapeutics for inflammatory arthritis. *Nature Communications*, 8, 14252.

Nasser, M. W., Raghuwanshi, S. K., Grant, D. J., Jala, V. R., Rajarathnam, K., & Richardson, R. M. (2009). Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. *Journal of Immunology*, 183(5), 3425–3432.

Németh, T., Sperandio, M., & Mócsai, A. (2020). Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(4), 253–275.

Nordenfelt, P., & Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(2), 271–284.

Oancea, C., Rüster, B., Henschler, R., Puccetti, E., & Ruthardt, M. (2010). The t(6;9) associated DEK/CAN fusion protein targets a population of long-term repopulating hematopoietic stem cells for leukemogenic transformation. *Leukemia*, 24(11), 1910–1919.

Othman, A., Sekheri, M., & Filep, J. G. (2022). Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity. *The FEBS Journal*, 289(14), 3932–3953.

Özçelik, E., Kalaycı, A., Çelik, B., Avcı, A., Akyol, H., Kılıç, İ. B., Güzel, T., Çetin, M., Öztürk, M. T., Çalışkaner, Z. O., Tombaz, M., Yoleri, D., Konu, Ö., & Kandilci,

A. (2022). Doxorubicin induces prolonged DNA damage signal in cells overexpressing DEK isoform-2. *PloS One*, 17(10), e0275476.

Panopoulos, A. D., & Watowich, S. S. (2008). Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine*, 42(3), 277–288.

Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691.

Park, H. H., Park, W., Lee, Y. Y., Kim, H., Seo, H. S., Choi, D. W., Kwon, H. K., Na, D. H., Kim, T. H., Choy, Y. B., Ahn, J. H., Lee, W., & Park, C. G. (2021). Bioinspired DNase-I-Coated Melanin-Like Nanospheres for Modulation of Infection-Associated NETosis Dysregulation. *Advanced Science*, 8(19), e2103748.

Park, J. H., & Lee, H. K. (2020). Re-analysis of Single Cell Transcriptome Reveals That the NR3C1-CXCL8-Neutrophil Axis Determines the Severity of COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 11, 2145.

Pastorek, M., Dúbrava, M., & Celec, P. (2022). On the Origin of Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 13.

Pease, N. A., Wise-Draper, T., & Privette Vinnedge, L. (2015). Dissecting the Potential Interplay of DEK Functions in Inflammation and Cancer. *Journal of Oncology*, 2015, 106517.

Pilsczek, F. H., Salina, D., Poon, K. K., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., Robbins, S. M., Green, F. H., Surette, M. G., Sugai, M., Bowden, M. G., Hussain, M., Zhang, K., & Kubes, P. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*, 185(12), 7413–7425.

Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., Bianchi, S., Jaconi, S., Culap, K., Zatta, F., De Marco, A., Peter, A., Guarino, B., Spreafico, R., Camerini, E., Case, J. B., Chen, R. E., Havenar-Daughton, C., Snell, G., Telenti, A., Virgin, H. W., Corti, D. (2020). Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*, 583(7815), 290–295.

Privette Vinnedge, L. M., McClaine, R., Wagh, P. K., Wikenheiser-Brokamp, K. A., Waltz, S. E., & Wells, S. I. (2011). The human DEK oncogene stimulates β -catenin signaling, invasion and mammosphere formation in breast cancer. *Oncogene*, 30(24), 2741–2752.

Qu, J., Jin, J., Zhang, M., & Ng, L. G. (2023). Neutrophil diversity and plasticity: Implications for organ transplantation. *Cellular & Molecular Immunology*, 20(9), 993–1001.

Ravindran, M., Khan, M. A., & Palaniyar, N. (2019). Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules*, 9(8), 365.

Rebernick, R., Fahmy, L., Glover, C., Bawadekar, M., Shim, D., Holmes, C. L., Rademacher, N., Potluri, H., Bartels, C. M., & Shelef, M. A. (2018). DNA Area and NETosis Analysis (DANA): a High-Throughput Method to Quantify Neutrophil Extracellular Traps in Fluorescent Microscope Images. *Biological Procedures Online*, 20, 7.

Remijsen, Q., Kuijpers, T. W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), 581–588.

Richards, M. K., Liu, F., Iwasaki, H., Akashi, K., & Link, D. C. (2003). Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood*, 102(10), 3562–3568.

Riveiro-Falkenbach, E., & Soengas, M. S. (2010). Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene. *Clinical Cancer Research*, 16(11), 2932–2938.

Roberts, A. W. (2005). G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!. *Growth Factors*, 23(1), 33–41.

Rodriguez-Rodriguez, P., Arroyo-Garcia, L. E., Tsagkogianni, C., Li, L., Wang, W., Végvári, Á., Salas-Allende, I., Plautz, Z., Cedazo-Minguez, A., Sinha, S. C., Troyanskaya, O., Flajolet, M., Yao, V., & Roussarie, J. P. (2024). A cell autonomous regulator of neuronal excitability modulates tau in Alzheimer's disease vulnerable neurons. *Brain*, awae051. Advance online publication.

Rong, N., Wei, X., & Liu, J. (2024). The Role of Neutrophil in COVID-19: Positive or Negative. *Journal of Innate Immunity*, 16(1), 80–95.

Rosales, C. (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?. *Frontiers in Physiology*, 9, 113.

Ruiz-Aravena, M., McKee, C., Gamble, A., Lunn, T., Morris, A., Snedden, C. E., Yinda, C. K., Port, J. R., Buchholz, D. W., Yeo, Y. Y., Faust, C., Jax, E., Dee, L., Jones, D. N., Kessler, M. K., Falvo, C., Crowley, D., Bharti, N., Brook, C. E., Aguilar, H. C., Plowright, R. K. (2022). Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 299–314.

Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E. J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S. B., Marstrand, T. T., Malde, M. K., Du, Z. Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A. K., Brand, C. L., Vidal, H., Kristiansen, K., & Frøyland, L. (2010). Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environmental Health Perspectives*, 118(4), 465–471.

Saha, A. K., Kappes, F., Mundade, A., Deutzmann, A., Rosmarin, D. M., Legendre, M., Chatain, N., Al-Obaidi, Z., Adams, B. S., Ploegh, H. L., Ferrando-May, E., Mor-Vaknin, N., & Markovitz, D. M. (2013). Intercellular trafficking of the nuclear oncoprotein DEK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6847–6852.

- Sajid, M., Marriam, S., Mukhtar, H., Sohail, S., Sajid, M., & Sehgal, S. A. (2022). Epitope-based peptide vaccine design and elucidation of novel compounds against 3C like protein of SARS-CoV-2. *PloS One*, 17(3), e0264700.
- Sammons, M., Wan, S. S., Vogel, N. L., Mientjes, E. J., Grosveld, G., & Ashburner, B. P. (2006). Negative regulation of the RelA/p65 transactivation function by the product of the DEK proto-oncogene. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 26802–26812.
- Sandahl, J. D., Coenen, E. A., Forestier, E., Harbott, J., Johansson, B., Kerndrup, G., Adachi, S., Auvrignon, A., Beverloo, H. B., Cayuela, J. M., Chilton, L., Fornerod, M., de Haas, V., Harrison, C. J., Inaba, H., Kaspers, G. J., Liang, D. C., Locatelli, F., Masetti, R., Perot, C., Hasle, H. (2014). t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study of 62 patients. *Haematologica*, 99(5), 865–872.
- Sandén, C., & Gullberg, U. (2015). The DEK oncoprotein and its emerging roles in gene regulation. *Leukemia*, 29(8), 1632–1636.
- Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., Umetsu, D., Ito, T., Takeyama, K., & Kato, S. (2010). A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes & Development*, 24(2), 159–170.
- Schymeinsky, J., Mócsai, A., & Walzog, B. (2007). Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thrombosis and Haemostasis*, 98(2), 262–273.
- Soekarman, D., von Lindern, M., van der Plas, D. C., Selleri, L., Bartram, C. R., Martiat, P., Culligan, D., Padua, R. A., Hasper-Voogt, K. P., & Hagemeijer, A. (1992). Dek-can rearrangement in translocation (6;9)(p23;q34). *Leukemia*, 6(6), 489–494.
- Son, Y. H., Jeong, Y. T., Lee, K. A., Choi, K. H., Kim, S. M., Rhim, B. Y., & Kim, K. (2008). Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 51(1), 71–77.
- Song, Y., Wang, Z., Jiang, J., Piao, Y., Bai, Q., Piao, Q., Li, L., Xu, C., Liu, H., Piao, H., Li, L., & Yan, G. (2022). miR-181-5p attenuates neutrophilic inflammation in asthma by targeting DEK. *International Immunopharmacology*, 112, 109243.
- Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (2003). Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 40(6), 643–672.
- Steinberg, B. E., & Grinstein, S. (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007(379), pe11.

Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502.

Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31(8), 318–324.

Thind, M. K., Uhlig, H. H., Glogauer, M., Palaniyar, N., Bourdon, C., Gwela, A., Lancioni, C. L., Berkley, J. A., Bandsma, R. H. J., & Farooqui, A. (2024). A metabolic perspective of the neutrophil life cycle: new avenues in immunometabolism. *Frontiers in Immunology*, 14, 1334205.

Veras, F. P., Pontelli, M. C., Silva, C. M., Toller-Kawahisa, J. E., de Lima, M., Nascimento, D. C., Schneider, A. H., Caetité, D., Tavares, L. A., Paiva, I. M., Rosales, R., Colón, D., Martins, R., Castro, I. A., Almeida, G. M., Lopes, M. I. F., Benatti, M. N., Bonjorno, L. P., Giannini, M. C., Luppino-Assad, R., Cunha, F. Q. (2020). SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(12), e20201129.

Von Lindern, M., Fornerod, M., van Baal, S., Jaegle, M., de Wit, T., Buijs, A., & Grosveld, G. (1992). The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, *dek* and *can*, and the expression of a chimeric, leukemia-specific *dek-can* mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 12(4), 1687–1697.

Vorobjeva, N. V., & Chernyak, B. V. (2020). NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(10), 1178–1190.

Waldmann, T., Baack, M., Richter, N., & Gruss, C. (2003). Structure-specific binding of the proto-oncogene protein DEK to DNA. *Nucleic Acids Research*, 31(23), 7003–7010.

Waldmann, T., Eckerich, C., Baack, M., & Gruss, C. (2002). The ubiquitous chromatin protein DEK alters the structure of DNA by introducing positive supercoils. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 24988–24994.

Waldmann, T., Scholten, I., Kappes, F., Hu, H. G., & Knippers, R. (2004). The DEK protein--an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin. *Gene*, 343(1), 1–9.

Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6.

Web1, (2024). <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>, (Erişim Tarihi: 29.03.2024)

Wichmann, I., Respaldiza, N., Garcia-Lozano, J. R., Montes, M., Sanchez-Roman, J., & Nuñez-Roldan, A. (2000). Autoantibodies to DEK oncoprotein in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and Experimental Immunology*, 119(3), 530–532.

- Wilcher, K. E., Page, E. R. H., & Privette Vinnedge, L. M. (2023). The impact of the chromatin binding DEK protein in hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, 123, 18–27.
- Wise-Draper, T. M., Allen, H. V., Jones, E. E., Habash, K. B., Matsuo, H., & Wells, S. I. (2006). Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7506–7519.
- Wise-Draper, T. M., Allen, H. V., Thobe, M. N., Jones, E. E., Habash, K. B., Münger, K., & Wells, S. I. (2005). The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. *Journal of Virology*, 79(22), 14309–14317.
- Wise-Draper, T. M., Mintz-Cole, R. A., Morris, T. A., Simpson, D. S., Wikenheiser-Brokamp, K. A., Currier, M. A., Cripe, T. P., Grosveld, G. C., & Wells, S. I. (2009). Overexpression of the cellular DEK protein promotes epithelial transformation in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 69(5), 1792–1799.
- Witter, A. R., Okunnu, B. M., & Berg, R. E. (2016). The Essential Role of Neutrophils during Infection with the Intracellular Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunology*, 197(5), 1557–1565.
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., & Ellison, R. T., 3rd (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, 61(2), 719–728.
- Yang, M. Q., Bai, L. L., Wang, Z., Lei, L., Zheng, Y. W., Li, Z. H., Huang, W. J., Liu, C. C., & Xu, H. T. (2021). DEK is highly expressed in breast cancer and is associated with malignant phenotype and progression. *Oncology Letters*, 21(6), 440.
- Yipp, B. G., & Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it?. *Blood*, 122(16), 2784–2794.
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., & Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18(9), 1386–1393.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., & Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death and Differentiation*, 16(11), 1438–1444.
- Yousefi, S., Simon, D., Stojkov, D., Karsonova, A., Karaulov, A., & Simon, H. U. (2020). In vivo evidence for extracellular DNA trap formation. *Cell Death & Disease*, 11(4), 300.

Yu, L., Huang, X., Zhang, W., Zhao, H., Wu, G., Lv, F., Shi, L., & Teng, Y. (2016). Critical role of DEK and its regulation in tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(18), 26844–26855.

Zarbock, A., & Ley, K. (2009). Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation*, 16(1), 31–42.

Zhou, H., Møhlenberg, M., Thakor, J. C., Tuli, H. S., Wang, P., Assaraf, Y. G., Dhama, K., & Jiang, S. (2022). Sensitivity to Vaccines, Therapeutic Antibodies, and Viral Entry Inhibitors and Advances To Counter the SARS-CoV-2 Omicron Variant. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(3), e0001422.

Zhu, S., Yu, Y., Ren, Y., Xu, L., Wang, H., Ling, X., Jin, L., Hu, Y., Zhang, H., Miao, C., & Guo, K. (2021). The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing. *Cell Death & Disease*, 12(11), 984.

Zhu, X., & Chen, J. (2019). Phosphoproteomic Analyses Provide Insight into Molecular Mechanisms Underlying NETosis. *Proteomics*, 19(19), e1900126.

Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Blair, C., Weber, A., Barnes, B. J., Egeblad, M., Woods, R. J., Kanthi, Y., & Knight, J. S. (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*, 5(11), e138999.

ÖZGEÇMİŞ

İrfan Baki KILIÇ lisans eğitimini Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde 2014-2018 yılları arasında tamamladı. Ardından aynı üniversitede 2018 – 2020 yılları arasında Moleküler ve Translasyonel Biyotıp bölümünde yüksek lisans eğitimini tamandı. Son olarak 2020 yılında doktora eğitimini almak üzere Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne başladı. Çalışmalarını Prof. Dr. Ayten Kandilci'nin danışmanlığında Moleküler Hematoloji Laboratuvarı'nda sürdürdü.



TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR

Özçelik, E., Kalaycı, A., Çelik, B., Avcı, A., Akyol, H., Kılıç, İ. B., Çakar, T., Çetin, M., Tuzlakoglu Öztürk, M., Çalışkaner, Z. O., & Kandilci, A. (2021, July 3-8). High level of DEK isoform-2 delays recovery from doxorubicin induced DNA damage. The 45th FEBS Congress, Ljubljana, Slovenia.

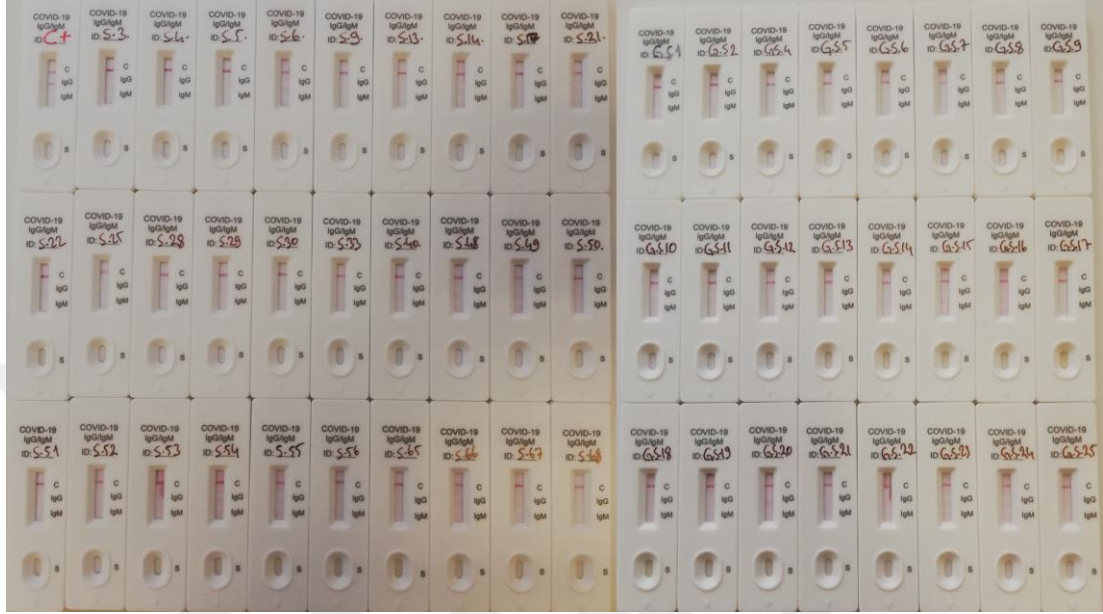
Kılıç, İ. B., Camcı, İ. Y., Çakar, T., Avcı, A., Karahasan, A., Çine, N., Yağcı, T., & Kandilci, A. (2021, September 1-4). DEK Level Was Reduced In The Serum Of Patients With Covid-19. 6th European Congress of Immunology (ECI 2021).

Özçelik, E., Kalaycı, A., Çelik, B., Avcı, A., Akyol, H., Kılıç, İ. B., Güzel, T., Çetin, M., Öztürk, M. T., Çalışkaner, Z. O., Tombaz, M., Yoleri, D., Konu, Ö., & Kandilci, A. (2022). Doxorubicin induces prolonged DNA damage signal in cells overexpressing DEK isoform-2. *PloS One*, 17(10), e0275476.

Kılıç, İ. B., Yaşar, A., Camcı, İ. Y., Güzel, T., Karahasan, A., Yağcı, T., Çine, N., & Kandilci, A. (2024). NETosis Induced by Serum of Patients with COVID-19 is Reduced with Reparixin or Antibodies Against DEK and IL-8. *Turkish Journal of Immunology*, 127–135.

EKLER

EK-A: Sağlık Serum COVID-19 IgG/ IgM Testi Görüntüleri



Şekil A1.1: Gebze Teknik Üniversitesindeki gönüllülerden ve Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik AD öğretim üyesi Doç. Dr. Naci Çine'den temin edilen sağlıklı birey serumlarının COVID-19 IgG- IgM hızlı antikor testi görüntüleri (C+: COVID-19 pozitif kontrol).

EK-B: Kullanılan Şekillerin Telif Hakkı Durumları

Tablo B1.1: Tezde kullanılan şekillerin telif hakkı durumları.

Şekil	Lisans Tarihi	Lisans Durumu	Telif Sahibi
Şekil 2.1	30.05.2024	5798791454513	Springer Nature
Şekil 2.2	29.03.2024	CC BY 4.0	Frontiers
Şekil 2.3	29.03.2024	CC BY 4.0	Springer Nature
Şekil 3.1	29.03.2024	CC BY 4.0	Oxford University Press
Şekil 4.1	29.03.2024	CC BY 4.0	PLOS Journals
Şekil 4.2	29.03.2024	CC BY 4.0	Frontiers
Şekil 4.3	29.03.2024	CC BY 4.0	JCI Insight